

**Deregulation transkriptioneller Netzwerke in Abhängigkeit von
onkogener KRAS-Signaltransduktion
in einem Ovarialkarzinom-Modell**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Iwona Stelniec

geboren am 18. Februar 1979 in Kattowitz/Polen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. rer. nat., habil. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. Richard Lucius
2. Prof. Dr. Reinhold Schäfer
3. Prof. Dr. Hanspeter Herzel

Tag der mündlichen Prüfung: 09. 02. 2010

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, den

Danksagung

An erster Stelle gilt mein ganz herzlicher Dank Herrn Prof. Reinhold Schäfer für die Überlassung und Betreuung dieses spannenden Themas, die viele konstruktive Kritik und die Zeit, die er immer für mich gehabt hat.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Herrn Prof. Lucius für die Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Meinen Kooperationspartnern Dr. Oleg Tchernitsa, Dr. Stefan Legewie, Dr. Nils Blüthgen und Dr. Balazs Gyorffy danke ich für die effiziente Zusammenarbeit, die Beantwortung der vielen Fragen und den regen E-Mail Austausch.

Bei Frau PD. Dr. Christine Sers und den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Pathologie möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, die dazu beigetragen hat, dass diese Zeit für mich als schöne und wertvolle Erfahrung in Erinnerung bleibt.

Mein ganz herzlicher Dank gilt Frau Sabine Bobbe, Cornelia Gieseler, Jana Keil und Maryam Sheykholeslami, die mich in dem Laboralltag nicht alleine ließen und auch zum Xten Mal bereitwillig meine Fragen beantworteten.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Alexander Groß, Ellen Hilgenberg, Simone Reuß, Nina Hering und Franziska Reinstaedtler für die Unterstützung und die schönen Stunden bedanken.

An Dr. Christian Klotz und meine Eltern richte ich einen ganz besonderen Dank dafür, dass sie für mich eine stetige Energiequelle sind.

Inhaltsverzeichnis

	Selbstständigkeitserklärung	I
	Danksagung	II
	Inhaltsverzeichnis	III
	Abbildungsverzeichnis	VII
	Tabellenverzeichnis	IX
	Zusammenfassung	1
	Abstract	2
1	Einleitung	3
1.1	Das Rose Zellsystem - ein Modell für Ovarialtumore	4
1.2	Tumoreigenschaften	6
1.2.1	Uneingeschränkte Proliferation	6
1.2.2	Epithelial-mesenchymale Transition	8
1.3	Ras-Proteinfamilie	10
1.4	Differenziell exprimierte Transkriptionsfaktoren als essentielle Mediatoren der neoplastischen Transformation	10
1.5	Ziele der Arbeit	12
2	Ergebnisse	14
2.1	Expression von FosI1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA im Rose Zellsystem	15
2.2	Transienter Knock-down mittels RNA-Interferenz	16
2.3	Untersuchungen zur funktionellen Rolle der Transkriptionsfaktoren in Rose A2/5 Zellen	18
2.3.1	Einfluss auf die zelluläre Morphologie	20
2.3.2	Einfluss auf die Proliferation	22
2.3.2.1	Proliferation der unbehandelten Rose 199 und Rose A2/5 Zellen	23
2.3.2.2	Proliferation der Rose A2/5 Zellen nach Zugabe des U0126-Inhibitors	24

2.3.2.3	Proliferation der Rose A2/5 Zellen nach Knock-down von Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA	25
2.3.3	Einfluss auf die Zellzyklusregulation	28
2.3.3.1	Zellzyklusanalysen der Rose 199 und Rose A2/5 Zellen	28
2.3.3.2	Zellzyklusanalysen der Rose A2/5 Zellen nach Knock-down von Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA	30
2.4	Rolle der differenziell exprimierten Transkriptionsfaktoren bei der KRAS-vermittelten Deregulation des Transkriptoms	32
2.4.1	Identifizierung der Zielgene von KRAS und den KRAS-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren	33
2.4.2	Einfluss der Transkriptionsfaktoren auf die KRAS-bedingte genetische Deregulation	35
2.4.3	Partielle Überlappung der Expressionsprofile	36
2.4.4	Zuordnung der ermittelten Zielgene und ihrer Produkte zu bereits bekannten biologischen Funktionen	38
2.5	Transkriptionelle Netzwerke im Rose Zellsystem	39
2.6	Validierung und Erweiterung des Modells der transkriptionellen Netzwerke	43
2.6.1	Validierung der Microarray-Daten mittels RT-PCR	43
2.6.2	Validierung der RNA-Analysen mittels Western Blot	44
2.6.3	Einfluss der Raf/Mek/Erk- und PI-3-K/Akt-Signalwege auf die Expression der KRAS-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren	50
2.6.4	Einfluss der KRAS-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren auf die Raf/Mek/Erk- und PI-3-K/Akt-Signalwege	52
3	Diskussion	54
3.1	Vergleich zwischen normalen Bedingungen, den Tumorzellen und dem Rose Zellsystem	54
3.2	Modell der Wechselwirkungen zwischen den transkriptionellen Netzwerken und der zytoplasmatischen Signaltransduktion	56
3.3	Rose A2/5 Zellen haben einen stammzellähnlichen Charakter	64
3.4	Ausblick	65

4	Methoden	67
4.1	Zellkulturmethoden	67
4.1.1	Kultivierung von Zelllinien	67
4.1.1.1	Auftauen von Zellen	67
4.1.1.2	Einfrieren von Zellen	67
4.1.2	Lebendzellzahlbestimmung mit Trypanblau	67
4.1.3	Analyse der Morphologie der Zellen	68
4.1.4	Transienter Knock-down	68
4.1.5	Analysen mit Inhibitoren	69
4.1.6	Proliferationstest	69
4.1.6.1	Herstellung PolyHEMA beschichteter 96-Well-Platten	69
4.1.6.2	Proliferationsmessung im XTT- und alamarBlue-Test	70
4.1.7	Zellzyklusanalysen	71
4.2	Molekularbiologische Methoden	71
4.2.1	RNA-Isolierung	71
4.2.1.1	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	72
4.2.2	RT-PCR	72
4.2.3	Herstellung von RASTA-2 Microarrays	73
4.2.3.1	Poly-L-Lysin-Beschichtung	74
4.2.3.2	Spotten der Chips und Blocken nach Bernsteinanhydrid-Methode	74
4.2.3.3	cDNA-Hybridisierung und Scannen der Microarrays	75
4.2.3.4	Auswertung der Microarrays	75
4.2.4	Proteinisolierung	75
4.2.4.1	Isolierung von Gesamtproteinen	75
4.2.4.2	Isolierung von Kernproteinen	76
4.2.4.3	Konzentrationsbestimmung der Proteine	76

4.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	77
4.2.6	Western Blot	77
4.2.6.1	Strippen von Membranen	78
4.3	Berechnungen und statistische Analysen	78
4.3.1	Berechnung der statistischer Signifikanz	78
4.3.2	Darstellung der Expressionsprofile der Microarray-Analysen	78
4.3.3	Berechnung der prozentualen Reversion aus Microarray-Daten	79
4.3.4	Hierarchische Clusteranalyse	79
5	Materialien	79
5.1	Laborgeräte und Materialien	79
5.2	Chemikalien	80
5.3	Kommerzielle Kits	81
5.4	Stammlösungen	82
5.5	Sequenzen für siRNA-Duplexe	85
5.6	Primer für RT-PCR	86
5.7	Antikörper	87
5.8	Zelllinien	87
5.9	Computer-Programme	87
6	Abkürzungsverzeichnis	88
7	Literatur	90
8	Anhang	102
9	Publikationen und Tagungsbeiträge	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Expression der epithelialen und mesenchymalen Markern im Rose Zellsystem.	5
Abbildung 2:	Zellzyklusphasen und deren Regulatoren.	8
Abbildung 3:	Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist eine Voraussetzung für die Metastasierung der Tumore.	9
Abbildung 4:	Ras und seine Zielgene: die Raf/Mek/Erk- und PI-3-K/Akt-Signaltransduktionswege.	11
Abbildung 5:	Expression der Transkriptionsfaktoren im Rose Zellsystem.	16
Abbildung 6:	Kinetik der mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren nach deren Knock-down in Rose A2/5 Zellen.	17
Abbildung 7:	Vergleich der mRNA- und Proteinspiegel der Transkriptionsfaktoren nach deren Knock-down in Rose A2/5 Zellen.	19
Abbildung 8:	Einfluss des Mek1/2-Inhibitors U0126 auf die Morphologie der Rose A2/5 Zellen.	20
Abbildung 9:	Einfluss der Knock-downs von Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA auf die Morphologie der Rose A2/5 Zellen.	21
Abbildung 10:	Vergleich der konventionellen Zellzählung mit XTT-Analysen.	22
Abbildung 11:	Ankerabhängige (2D) und ankerunabhängige (3D) Proliferation der Rose 199 und Rose A2/5 Zellen.	23
Abbildung 12:	Einfluss des Mek1/2-Inhibitors U0126 auf die ankerabhängige (2D) und ankerunabhängige (3D) Proliferation der Rose A2/5 Zellen.	24
Abbildung 13:	Einfluss der Knock-downs von Otx1, Gfi1 und RelA auf die ankerabhängige (2D) und ankerunabhängige (3D) Proliferation von Rose A2/5 Zellen.	25
Abbildung 14:	Einfluss der Knock-downs von Fos11, Hmga2, Klf6, JunB auf die ankerabhängige (2D) und ankerunabhängige (3D) Proliferation von Rose A2/5 Zellen.	26
Abbildung 15:	Vergleich der Ergebnisse der alamarBlue- und XTT-Tests.	27
Abbildung 16:	Zellzyklusanalysen von Rose 199 und Rose A2/5 Zellen.	29

Abbildung 17:	Einfluss von Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA auf die Zellzyklusregulation.	30
Abbildung 18:	Zusammenfassung der Zellzyklusanalysen.	31
Abbildung 19:	Ergebnisse der Microarray-Analysen.	34
Abbildung 20:	Partielle Überlappung der Zielgene von KRAS, Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA.	37
Abbildung 21:	Biologische Funktionen der Produkte aller 329 Gene, die auf dem RASTA-2 Microarray vertreten waren.	38
Abbildung 22:	Hypothetische Netzwerkregulation der untersuchten Transkriptionsfaktoren.	41
Abbildung 23:	Modell für Wahrscheinlichkeiten einer direkten Interaktion zwischen Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA.	43
Abbildung 24:	Validierung der Microarray Daten mittels RT-PCR.	44
Abbildung 25:	Validierung der RNA-Analysen mittels Western Blot.	46
Abbildung 26:	Vergleich der relativen Expressionsmenge der RNA- und Proteine der Transkriptionsfaktoren Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA.	48
Abbildung 27:	Mögliche Ursachen für gemessene RNA- und Proteindiskrepanzen.	49
Abbildung 28:	Regulation der RNA- und Proteinexpression der KRAS-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren durch die Raf/Mek/Erk- und die PI-3-K-Signalkaskaden.	51
Abbildung 29:	Hypothetische Möglichkeiten für die Wirkungsweise von Transkriptionsfaktoren.	52
Abbildung 30:	Regulatorischer Einfluss der ausgewählten Transkriptionsfaktoren auf die Signaltransduktion.	53
Abbildung 31:	Modell der Wechselwirkungen zwischen transkriptionellen Netzwerken und der zytoplasmatischen Signaltransduktion auf Grundlage der RNA-Interferenzstudien und Microarray-Analysen.	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Liste der differenziell exprimierten Transkriptionsfaktoren im Rose Zellsystem.	14
Tabelle 2:	Einfluss der untersuchten Transkriptionsfaktoren auf die Expression der KRAS-abhängig regulierten Gene.	36
Tabelle 3:	Biologische Funktion der Zielgene von KRAS und der KRAS-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren Fos1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA.	39
Tabelle 4:	Vergleich der Expression von Fos1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA.	40
Tabelle 5:	Vergleich der Microarray- und RT-PCR-Ergebnisse.	45
Tabelle 6:	Vergleich der normalen und der tumorabhängigen Expression und Funktion von Fos1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA im Rose Zellsystem mit publizierten Ergebnissen anderer Tumore und Zelllinien.	55

Zusammenfassung

Tumormodelle, in denen die maligne Transformation durch definierte Onkogene experimentell ausgelöst und unterhalten wird, bieten vielfältige Möglichkeiten, die komplexen Mechanismen der Tumorentstehung und Therapieresistenz zu untersuchen und neue Ansätze für Diagnostik und Therapie auszuarbeiten. KRAS-Onkogen-„getriebene“ Transformationsmodelle spiegeln neben anderen tumorspezifischen Veränderungen insbesondere die charakteristischen Änderungen des Transkriptoms wider. In der vorliegenden Arbeit wird ein Modell für Ovarialtumore auf Grundlage von Rose Zellen („Rat ovarian surface epithelium“) verwendet, um die Rolle von Transkriptionsfaktoren, welche durch die KRAS-vermittelte Signaltransduktion hoch reguliert werden, zu untersuchen. Die KRAS-transformierten Derivate der normalen Rose Zellen zeigen die typischen Merkmale von ankerunabhängigen und invasiven Tumorzellen. Aufgrund der hohen Komplexität sind die Interaktionen zwischen der zytoplasmatischen Signaltransduktion und dem durch sie regulierten Transkriptionsfaktornetzwerk noch weitgehend unverstanden. Die Transkriptionsfaktoren Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA wurden systematisch mittels RNA-Interferenz in KRAS-transformierten Rose Zellen transient ausgeschaltet. Danach wurden Proliferation, Morphologie (epithelial-mesenchymale Transition, EMT) und Ankerunabhängigkeit der Zellen bestimmt. Alle untersuchten Transkriptionsfaktoren beeinflussten die KRAS-induzierten morphologischen Veränderungen teilweise, belegt durch die Abnahme der EMT-Merkmale nach siRNA-vermittelter Ausschaltung. Der Knock-down der Transkriptionsfaktoren Otx1, Gfi1 und RelA hemmte die Proliferation, während Fos11, Hmga2, Klf6 und JunB die generelle Proliferationsfähigkeit nicht beeinflussten, jedoch spezifisch die ankerunabhängige Proliferation blockierten. Diesen Faktoren kommt daher eine spezifische Funktion in der neoplastischen Transformation zu, da die Ankerunabhängigkeit sehr gut mit der Tumorigenität korreliert ist. Um die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren an der Deregulation von Zielgenen zu erfassen, wurden Genexpressionsmuster aller Zellen, in denen jeweils ein Faktor durch siRNA ausgeschaltet war, mittels Microarray-Analyse identifiziert. Auf dieser Grundlage wurde ein Netzwerk-Modell der regulatorischen Interaktionen zwischen den Transkriptionsfaktoren berechnet. Die Existenz der beiden funktionellen Gruppen wurde im Modell bestätigt. Darüber hinaus zeigte sich eine gegenseitige Abhängigkeit des transkriptionellen Netzwerks und der zytoplasmatischen Signaltransduktion, gemessen mittels Proteinanalyse der mitogenabhängigen Signalkinasen (MAPK). Diese wird als kompensatorische Regulation interpretiert, welche trotz Perturbation, experimentell durch siRNA, das effiziente Überleben der transformierten Zellen sicherstellt. Die vorliegende Studie schafft somit die Voraussetzung und Motivation, das reduzierte Netzwerk aus sieben Komponenten auf alle differentiell exprimierten Transkriptionsfaktoren zu erweitern. Möglicherweise behindern solche Regulationskreise in der klinischen Situation die effektive Wirkung zielgerichteter Therapien.

Schlagwörter: Ovarialtumore, KRAS-Onkogen, Signaltransduktion, Transkriptionelle Netzwerke, Modular response analysis (MRA), RNA-Interferenz

Abstract

Tumor models, in which malignant transformation was experimentally triggered and maintained through defined oncogenes, offer manifold opportunities to determine the complex mechanisms of tumor progression and resistance to therapies, and to develop new strategies for diagnosis and therapy. Particularly, KRAS oncogene driven models of transformation reflect the characteristic alterations of the transcriptome, among other tumor specific changes. In the present work a model for ovarian cancer based on Rose („Rat ovarian surface epithelium“) cells has been used to evaluate the role of transcription factors, which are up-regulated through KRAS dependent signaling. The KRAS transformed derivatives of normal ROSE cells exhibit typical characteristics of anchorage-independent and invasive tumor cells. Due to the high complexity of cellular networks, the interactions between cytoplasmic signalling and their regulated transcription factors are not well understood. The transcription factors Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 and RelA were systematically eliminated by transient RNA interference in KRAS transformed ROSE cells. The proliferation, morphology (epithelial-mesenchymal transition, EMT) and anchorage-independence of the cells were determined. All of the selected transcription factors had partial effect on the KRAS induced morphologic changes, documented by reduction of EMT-properties after siRNA treatment. The knock-down of the transcription factors Otx1, Gfi1 and RelA blocked proliferation in general, whereas Fosl1, Hmga2, Klf6 and JunB had no influence on proliferation but specifically blocked the anchorage-independence. Thus, these factors exhibited essential functions in the process of neoplastic transformation, because the anchorage-independence correlates very well with tumorigenicity. In order to elucidate the involvement of the transcription factors in the genetic deregulation of their target genes, microarray based gene expression profiles were determined from all cells in which one factor was eliminated by siRNA. Based on these data, a network model of regulatory interactions among these transcription factors was calculated. The existence of both functional groups was confirmed by the model. Furthermore, an interdependence of the transcriptional networks and cytoplasmic signaling was observed by protein analysis of the mitogen dependent signal kinases (MAPK). This was interpreted as compensatory regulation, which in spite of experimental perturbation by siRNA, permitted efficient survival of the transformed cells. Thus, the present work provides the basis and motivation to extend the reduced network composed of seven components to all regulated transcription factors. Potentially, such regulatory networks diminish the efficacy of targeted therapies in clinical situations.

Keywords: ovarian carcinoma, KRAS oncogene, signal transduction, transcriptional networks, modular response analysis (MRA), RNA interference

1 Einleitung

Die Entwicklung progressiver, metastasierender Tumore ist ein mehrstufiger Prozess, der durch eine Aktivierung von krebsfördernden (Onkogene) und Inaktivierung von krebshemmenden Faktoren (Tumorsuppressoren) gekennzeichnet ist. Dies führt zur Deregulation der streng regulierten zellulären Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Den deregulierten Prozessen liegen massive Transkriptomveränderungen zugrunde. Dies zeigen Analysen in Tumorzellkulturmodellen zur Charakterisierung von Zielgenen der Onkogene „Harvey rat sarcoma virus oncogene“ (H-Ras) und „Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog“ (KRAS). Die kontinuierliche Aktivierung eines Onkogens in immortalisierten Zellen bringt bereits eine Vielzahl genetischer Alterationen mit sich, die sowohl eine Überexpression als auch eine Herunterregulation von Zielgenen umfassen. Bei der Herunterregulation von KRAS-Zielgenen spielt ebenfalls die epigenetische Stilllegung durch DNA-Methyltransferasen eine wichtige Rolle. Die charakterisierten Zielgene von H-Ras und KRAS haben bekannte Funktionen in der Regulation von Proliferation, Invasion und Metastasenausbildung. Die Deregulation des genetischen Programms fördert somit den Erwerb neuer Eigenschaften durch Tumorzellen im Vergleich zu dem umliegenden Gewebe, in dem sie sich entwickeln (Sers, et al., 2009; Sers, et al., 2002; Tchernitsa, et al., 2004; Zuber, et al., 2000).

Für die Tumorentstehung sind genetische Alterationen notwendig und die Komplexität der Tumorprogression wird somit durch die vielfältigen Transkriptomveränderungen bedingt. Sehr vereinfacht dargestellt ist die Tumorentwicklung *in situ* unter anderem durch die Fähigkeit zur uneingeschränkten (2D) Proliferation und die Unempfindlichkeit gegenüber Apoptose auslösenden Signalen gekennzeichnet. Solide, metastasierende Tumore weisen zudem die Fähigkeit der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), der Ankerunabhängigkeit (3D) und Angiogenese auf, die deren Invasionspotential und Metastasenausbildung ermöglicht (Bellovin, et al., 2005; Hoffman, et al., 1993; Hotz, et al., 2007).

Obwohl die Vorgänge, die die Tumorprogression vorantreiben sehr komplex sind, resultieren diese aus einem allgemeingültigen Muster was den Erwerb neuer Eigenschaften von Tumorzellen betrifft. Diese neuen Merkmale von Zellen können in geeigneten Tumormodellen *in vitro* und *in vivo* erfasst und untersucht werden.

1.1 Das Rose Zellsystem - ein Modell für Ovarialtumore

Die häufigsten Tumore im Genitaltrakt sind Ovarialtumore. Aufgrund fehlender Frühsymptomatik ist diese Tumorerkrankung von einer hohen Sterblichkeitsrate der Patienten begleitet, da eine Diagnose meistens erst im fortgeschrittenen Metastasierungsstadium getroffen wird. Die späten Diagnosen und die damit verbundene fehlende Erfassung von Daten zum Verlauf der Erkrankung führen zu einem mangelnden Verständnis der Progression der Ovarialtumore (Boring, et al., 1992).

Modellsysteme für Ovarialtumore, mit deren Hilfe man die Auswirkungen von gezielten Mutationen in Onkogenen auf die Transformation und Tumorprogression untersuchen kann, gehören daher zu einem wichtigen Werkzeug *in vitro*. Zu Zellkulturmodellsystemen für Ovarialtumore gehört das „Rat ovarian surface epithelium“ (Rose) Zellsystem, das aus spontan immortalisierten Rose 199 Zellen und deren KRAS-transformierten Derivaten, Rose A2/5 Zellen, besteht.

Die spontan immortalisierten Rose 199 Zellen zeigen eine epithelial-ähnliche Morphologie und einen aktiven „Phosphoinositide-3-kinase“-Signalweg (PI-3-K). Diese Zellen können uneingeschränkt, ankerabhängig (2D) proliferieren (Adams and Auersperg, 1985; Tchernitsa, et al., 2004).

Die Rose A2/5 Zellen entstanden durch eine stabile Transfektion mit dem humanen KRAS-Onkogen unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors für den Elongationsfaktor EF-1 α in Rose 199 Zellen (Tchernitsa, et al., 2004). Alle Änderungen im Transkriptom sowie im zellulären Phänotyp können somit auf das kontinuierlich aktive KRAS zurückgeführt werden. Die Zellen zeigen einen aktiven „V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog“/„Mitogen-activated protein kinase kinase“/„extracellular signal-regulated kinase“-Signalweg (Raf/Mek/Erk) und stark erhöhte Spiegel von pErk. Die Analysen des Transkriptoms mittels „customized“-Microarray, „Ras signaling target array“ (RASTA), zeigten eine Deregulation des genetischen Programms der Rose A2/5 Zellen im Vergleich zu den nicht-transformierten Rose 199 Zellen. Diese geht mit einer Herunter- bzw. Hochregulation einer Vielzahl von Genen mit Funktionen in Proliferation, Invasion, Apoptose, Angiogenese und Metastasierung einher (Tchernitsa, et al., 2004).

Die phänotypischen Änderungen umfassen die Fähigkeit zur Proliferation ohne Verankerung auf „Poly-2-Hydroxyethyl-Methacrylate“ (PolyHEMA) beschichteten Oberflächen. Diese Eigenschaft der ankerunabhängigen (3D) Proliferation stellt ein *in*

vitro Korrelat für deren Malignität dar. Zudem zeigen die Rose A2/5 Zellen anstelle einer epithelial-ähnlichen Morphologie eine mesenchymal-ähnliche Morphologie. Diese ist auf EMT zurückzuführen. Folglich sind in Rose A2/5 Zellen die epithelialen Marker, wie E-cadherin, herunterreguliert und gleichzeitig die E-cadherin-Inhibitoren Snail, Slug und Twist überexprimiert (Abb. 1).

Auf der Suche nach Faktoren, die eine Rolle in der Transformation der Rose A2/5 Zellen spielen, wurden bereits die Transkriptionsfaktoren „Fos-related antigen 1“ (Fosl1) bzw. „High mobility group AT-hook 2“ (Hmga2) identifiziert. Deren Knock-down in Rose A2/5 Zellen resultierte in beiden Fällen in einer partiellen Reversion der ankerunabhängigen (3D) Proliferation sowie der mesenchymalen Morphologie (Tchernitsa, et al., 2004; Malek, Stelniec, et al., 2009 eingereicht). Dieses Ergebnis korrelierte mit bereits publizierten Daten, die eine generelle Funktion der Faktoren Hmga2 und Fosl1 in der Zelltransformation zeigen (Vallone, et al., 1997).

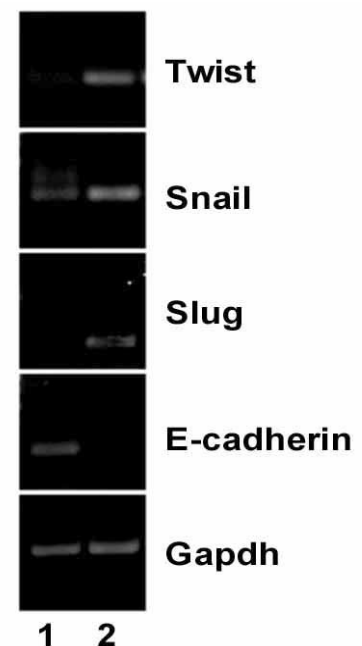
Abb. 1 Expression der epithelialen und mesenchymalen Markern im Rose Zellsystem.

Nachweis der mRNA-Expression von Twist, Snail, Slug, E-cadherin und Gapdh durch RT-PCR mit Gesamt-RNA aus Rose A2/5 und Rose 199 Zellen nach Auftrennung der Proben im 1-1,5%-igen Agarosegel.

1) In nicht-transformierten Rose 199 Zellen findet die Expression vom epithelialen Marker E-cadherin statt.

2) In K-Ras-transformierten Derivaten der Rose 199 Zellen, Rose A2/5, werden die Transkriptionsfaktoren Twist, Snail und Slug, die als Inhibitoren von E-cadherin wirken, überexprimiert. Eine Expression von E-cadherin ist folglich nicht nachweisbar.

(Malek, Stelniec, et al., 2009 eingereicht)



Das Rose-Zellsystem erlaubt somit direkte Vergleiche zwischen nicht-transformierten und KRAS-transformierten Zellen. Es eignet sich zur Bestimmung des Einflusses von individuellen Faktoren auf die Tumoreigenschaften von malignen Rose A2/5 Zellen, wie Ankerunabhängigkeit und EMT.

1.2 Tumoreigenschaften

1.2.1 Uneingeschränkte Proliferation

Tumore zeigen *in situ* die Fähigkeit zur uneingeschränkten (2D) Proliferation, die normalerweise auf die Embryonalentwicklung sowie auf einzelne Zelltypen im adulten Organismus beschränkt ist. Zu diesen einzelnen Zelltypen gehören unter anderem die Stammzellen des Darms, der Lunge, der Haut und die hämatopoetischen Zellen. Die Faktoren, die zum Beispiel bei der Bildung von Blutzellen und in der Embryonalentwicklung eine Rolle spielen, werden oft in Krebszellen im reaktivierten Zustand gefunden, wie die Transkriptionsfaktoren aus der „Activator protein 1“-Familie (Ap-1) sowie der Transkriptionsfaktor „Orthodenticle homolog 1“ (Otx1) (Crish, et al., 2002; Levantini, et al., 2003; Schreiber, et al., 2000; Verstappen, et al., 2009). Der Fähigkeit zur uneingeschränkten Proliferation von Tumorzellen liegt der Verlust der Empfindlichkeit gegenüber externen Wachstumssignalen zugrunde. Das setzt eine Inaktivierung von krebshemmenden Kontrollmechanismen (Tumorsuppressoren) und eine Überexpression von krebsfördernden Überlebenssignalen (Onkogene) voraus.

Onkogene. Zu den typischen krebsfördernden Faktoren gehören Regulatoren, die die Proliferation und das Überleben der Zellen sichern, wie die Ras/Raf/Mek/Erk- und die PI-3-K-Signalkaskaden. Die Raf/Mek/Erk-Signalkaskade steuert das Wachstum der Zellen während der Mitose bzw. während der pro- und anti-inflammatorischen Antwort in Abhängigkeit vom zellulären Kontext (Marshall, 1995; Salojin and Oravecz, 2007). Die PI-3-K verhindert das Einleiten der Apoptose durch Hemmung von pro-apoptotischen Proteinen, wie „BCL2-associated X protein“ (Bax), und trägt somit zum Überleben der Zellen bei (Xin and Deng, 2005).

Die Überexpression von Rezeptoren, wie dem „Epidermal growth factor“ (EGF), dem „Transforming growth factor beta“ (TGF- β) und dem „Estrogen receptor-alpha“ (ER- α), löst durch die kontinuierliche Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskaden ebenfalls die Tumorprogression aus (Andl, et al., 2003; Roberts, et al., 2006; Tan, et al., 2009).

Tumorsuppressoren. Zu krebshemmenden Faktoren gehören ebenfalls Zellzyklusregulatoren, die das Wachstum der Zellen über den Zellzyklus steuern.

Daher weisen die Tumorzellen im Vergleich zu normalen ausdifferenzierten Körperzellen eine deregulierte Expression von Zellzyklusregulatoren auf. Auf Grund dessen ist bei Tumorzellen die Dauer der G1- und G2-Checkpoints, die zur Überprüfung der DNA-Intaktheit dienen, sehr kurz. Auch in Fällen von genetischen Schäden teilen sich Tumorzellen weiter, was durch das Fehlen von Kontrollproteinen verursacht wird. Die bekanntesten Tumorsuppressoren, die dabei eine Rolle spielen sind: „Tumor protein p53“ (p53), „Retinoblastoma-associated protein“ (Rb) und „Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A„ (p16) (Gallagher and Brown, 1999; Iwasa, et al., 2008; Robert, et al., 2000).

Die Krebszellen sind durch Unempfindlichkeit gegenüber Apoptose-auslösenden Signalen gekennzeichnet. Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, der im Falle von irreparablen DNA-Schäden durch den Tumorsuppressor p53 eingeleitet wird. Die Aktivierung von p53 führt zur Expression von „Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A“ (p21), einem Zellzyklusregulator an dem Übergang von G1-S-Phase. Die Expression von p21 bewirkt das Anhalten des Zellzyklus. Dies ermöglicht die Reparatur von DNA-Schäden bzw. führt im Falle von irreparablen Schäden zur Induktion des Apoptose vermittelnden Proteins Bax. Daher wird die Apoptose durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors p53 in Tumorzellen auch bei größeren DNA-Schäden nicht eingeleitet (Ehlert and Kubbutat, 2001; Li and Ho, 1998; Sidransky, et al., 1992). Auch die PI-3-K und das onkogene Ras führen über die Aktivität des Transkriptionsfaktors RelA aus der „Nuclear factor NF-kappaB p65 subunit“-Familie (NF-kappaB) zur Inaktivierung des Apoptose vermittelnden p53 Proteins, was das Überleben der transformierten Zellen sicherstellt (Mayo, et al., 1997).

Einige Transkriptionsfaktoren, wie „Growth factor independent 1“ (Gfi1), Fos1 und Hmga2, beeinflussen ebenfalls die Zellzyklusregulation. Diese Faktoren steuern jedoch den Übergang aus der G1-Phase in die S-Phase sowie von der G2-Phase in die M-Phase auf einem p53-unabhängigen Weg über eine direkte Regulation der Cyclin-Expression oder Rb-Proteinexpression (Casalino, et al., 2007; Karsunky, et al., 2002; Tessari, et al., 2003), (Abb. 2).

Rb ist ein weiterer Tumorsuppressor, der eine wichtige Rolle bei der Zellzyklussteuerung der Zellen spielt. In seiner nicht-phosphorylierten Form bindet es den Transkriptionsfaktor E2F, der für die Expression der S-Phase-Regulatoren verantwortlich ist und die Zelle am Eintritt in die S-Phase hindert. Durch eine kontinuierliche Aktivierung der Ras-Signalkaskade wird eine Überexpression des CyclinD und somit der nachgeschalteten cyclinabhängigen Kinasen erreicht, was

eine anhaltende Phosphorylierung des Rb Proteins bewirkt. Folglich wird der Faktor E2F nicht mehr durch Rb gebunden. Dies geht mit dem Eintritt der Zellen in die S-Phase einher (Sage, et al., 2000).

Als Folge der Zellzyklusderegulation findet eine Anhäufung von Mutationen und die damit verbundenen Instabilitäten im Genom der Krebszellen statt, was im Endeffekt zur Entstehung der hochgradig malignen Tumore führt (Goel, et al., 2003; Hiyama, et al., 2004; Lengauer, et al., 1997).

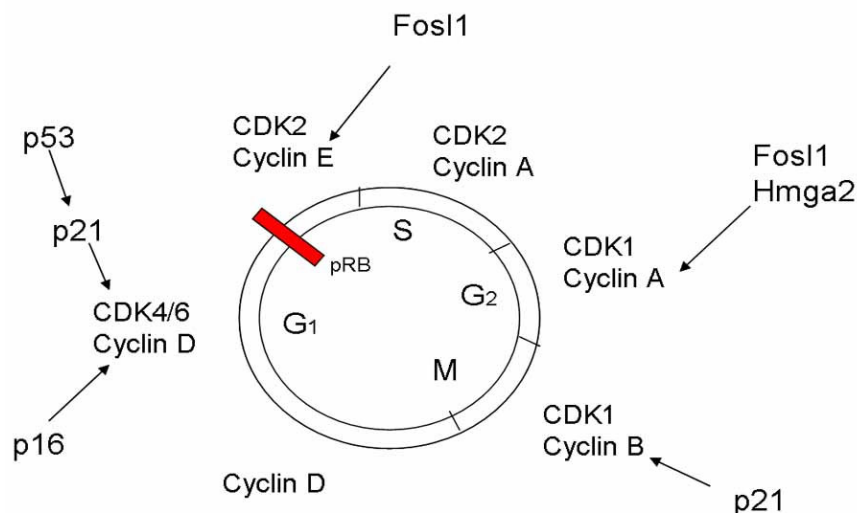


Abb. 2 Zellzyklusphasen und deren Regulatoren.

Die Zellzyklusphasen werden durch Cycline und cyclinabhängige Kinasen gesteuert. Tumorsuppressoren p53, p16 und Rb hemmen den G1-S-Phase-Übergang und lösen Apoptose aus. Proto-Onkogene, wie Fosl1, Hmga2, beschleunigen durch direkten Einfluss auf die Expression von Cyclinen E und A den Eintritt der Zellen in die S- bzw. M-Phase.

1.2.2 Epithelial-mesenchymale Transition

Tumore mit einer hochgradigen Malignität und Progression zeichnen sich an der Invasionsfront durch die Fähigkeit zur EMT aus. *In vitro* ist die EMT folglich ein Korrelat für deren Malignität.

EMT ist ein Prozess, der normalerweise während der Embryogenese bei der Ausbildung vom Mesenchym stattfindet und zu einer reduzierten Bindung des Epitheliums im Embryo und zur Zellmigration führt (Cheung, et al., 2005; Eastham, et al., 2007).

Es gibt eine signifikante Übereinstimmung zwischen Kontrollmechanismen, die Invasion, Migration und somit das Metastasierungspotential der Krebszellen und die EMT in embryonalen Zellen regulieren (Kurrey, et al., 2005; Nieto, 2008; Palacios, et

al., 2005; Thiery, 2003). In beiden Fällen wird die Migration der Zellen durch spezifische morphologische Änderungen begleitet, die eine Umstrukturierung der zytoskelettalen Komponenten und den Verlust von Zell-Zell-Kontakten umfassen, was im Endeffekt zum Verlust der Adhäsionseigenschaften der Zellen führt. Die Zellen zeigen dabei eine Herunterregulation in der Expression von epithelialen Markern, wie E-cadherin, α - und β -Catenin, und gleichzeitig eine Expression von mesenchymalen Markern, wie Fibronectin, Vimentin und N-Cadherin. Als die treibende Kraft für EMT wurden die TGF- β -, die NF-kappaB-, die PI-3-K- und die Raf/Mek/Erk-Signalkaskade charakterisiert. Die extrazellulären Signale induzieren die Expression von Transkriptionsfaktoren, wie „Snail homolog 1“ (Slug), Snail, Twist oder „Survival of motor neuron protein interacting protein 1“ (Sip1), die zu den prominenten Regulatoren der EMT gehören, indem sie die Expression von E-cadherin hemmen, dem häufigsten Zelladhäsionsmolekül (CAM) in epithelialen Zellen (Kurrey, et al., 2005; Nieto, 2008; Palacios, et al., 2005; Thiery, 2003), (Abb. 3).

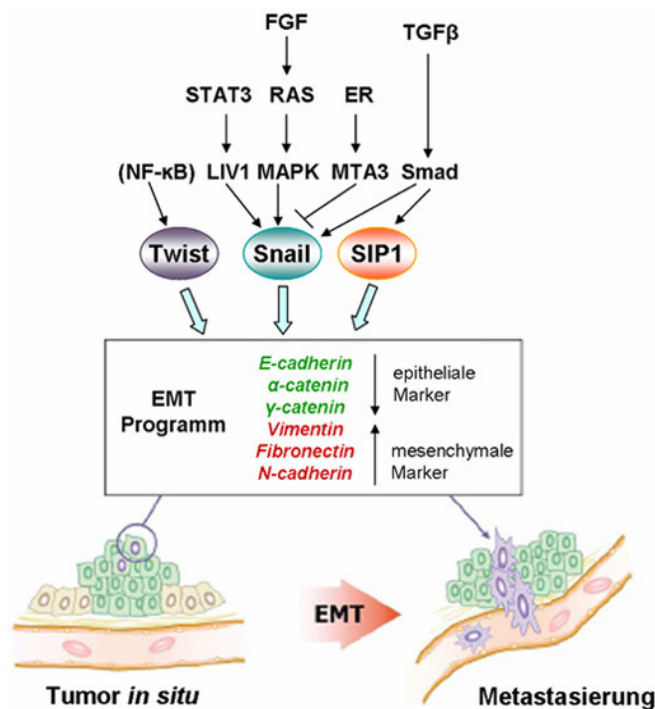


Abb. 3 Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist eine Voraussetzung für die Metastasierung der Tumore.

Bei der EMT werden epitheliale Marker herunterreguliert und mesenchymale Marker überexprimiert. Zu den bekanntesten Regulatoren der EMT gehören die Transkriptionsfaktoren Twist, Snail und Slug (Modifiziert nach Kang and Massague, 2004).

Die EMT ist somit eine Voraussetzung für Metastasenausbildung während der Tumorprogression, da die Tumorzellen die Fähigkeit erworben haben ohne Zell-Zell-Kontakte zu überleben (Gupta, et al., 2005).

1.3 Ras-Proteinfamilie

Die Ras-Proteine gehören mit 30 % zu den am häufigsten mutierten Onkogenen in menschlichen Tumoren (Bos, 1989; Schleger, et al., 2000).

Die Familie der kleinen GDP/GTP-bindenden Ras-Proteine, zu der H-Ras, „Neuroblastoma ras viral (v-ras) oncogene homolog“ (N-Ras) und KRAS gehören, wird durch Austausch von gebundenem GDP gegen GTP mit Hilfe von Proteinen, wie „Son of sevenless“ (SOS), aktiviert. Viele Punktmutationen in Ras-Proteinen, die zu deren kontinuierlichen Aktivierung führen, betreffen diese Austauschstelle. Dabei treten die häufigsten humanen Mutationen im Codon 12, 13, 14 und 61 auf (Bos, 1989; Hu, et al., 2003).

Die kontinuierliche Aktivierung von mutiertem Ras führt zur Überexpression seiner nachgeschalteten Zielgene Raf/Mek/Erk, PI-3-K und „Ral guanine nucleotide dissociation stimulator“ (RalGDS) (Agapova, et al., 2004; Rodriguez-Viciano, et al., 1994; Yan, et al., 1998). Die PI-3-K ist als „Überlebenskinase“ bekannt, da ihr direktes Target, „V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1“ (Akt), die Funktion von pro-apoptotischen Faktoren, zum Beispiel Bax, inaktiviert und somit die Einleitung der Apoptose hemmt (Xin and Deng, 2005). Eine gleichzeitige Aktivierung der Raf/Mek/Erk- und der PI-3-K-Signalkaskade gilt als Voraussetzung für die Transformation der Zellen, da in nicht immortalisierten Zellen das onkogene Ras die Apoptose auslöst (Madrid, et al., 2000; Mayo, et al., 1997; Nesterov, et al., 2004; Pervin, et al., 2003). Zu den Zielgenen von pErk und pAkt gehören viele Transkriptionsfaktoren, die im Endeffekt den Einfluss von Ras auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose steuern. Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehören die Mitglieder der Ap-1-Familie und Hmga2 (Battista, et al., 1998; Berlingieri, et al., 1995), (Abb. 4).

1.4 Differenziell exprimierte Transkriptionsfaktoren als essentielle Mediatoren der neoplastischen Transformation

Die metastasierenden Tumore weisen einen hohen Grad an Resistenzen gegenüber existierenden Therapien auf (Breccia, et al., 2009; Kastiris, et al., 2009; Lu, et al., 2009; You, et al., 2009). Aus diesem Grund werden intensive Studien betrieben, die zum Verständnis der Vorgänge bei der Tumorentwicklung beitragen und die Suche nach neuen therapeutischen Markern ermöglichen sollen.

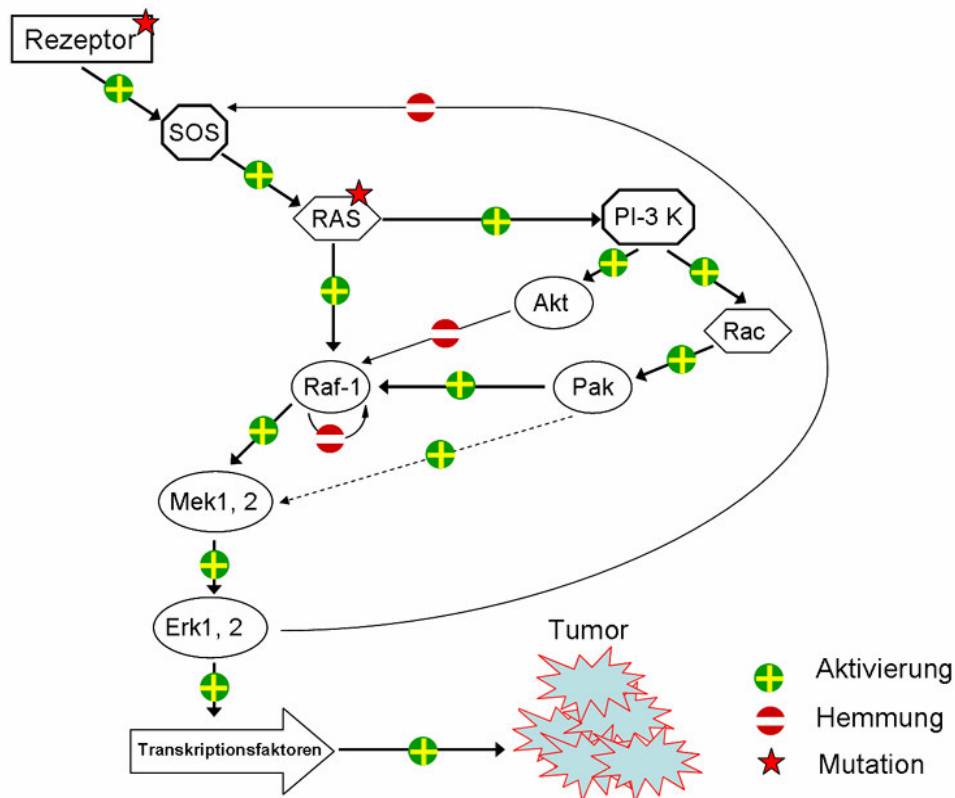


Abb. 4 Ras und seine Zielgene: die Raf/Mek/Erk- und PI-3-K/Akt-Signaltransduktionswege.

Mutationen im Ras-Onkogen führen zu dessen kontinuierlichen Aktivität. Dies hat eine permanente Aktivierung der nachgeschalteten Ras-Zielgene und die damit verbundene Tumorprogression und Transformation der Zellen zur Folge (Modifiziert nach Kolch, 2000).

Für vorklinische Studien zur Klassifizierung der funktionellen Rolle von potentiellen therapeutischen Markern haben sich Arbeiten in Zellkulturmodellen in Kombination mit RNA-Interferenz und den Analysen vom Transkriptom mittels Microarray-Technologie als sehr effektiv erwiesen. Die RNA-Interferenz bietet die Möglichkeit die Menge eines Ziel-Transkripts signifikant zu reduzieren und dadurch dessen Rolle bei den Vorgängen in der Zelle zu untersuchen. Bei transienten siRNA-Experimenten bleibt das Genom unverändert, daher entstehen nur wenige Anpassungsmöglichkeiten für die Zellen, was einen großen Vorteil gegenüber stabilen genetischen Manipulationen darstellt.

Bei der Interferenztechnik werden kurze siRNA-Duplexe verwendet, die komplementär zur einer Ziel-mRNA sind. Nach Anlagerung an die Ziel-mRNA wird die so entstandene doppelsträngige RNA zerschnitten. Als Folge dieses Knock-downs nimmt die Menge der Ziel-mRNA und damit die des kodierten Proteins drastisch ab. In funktionellen Studien und genomweiten Analysen kann nachfolgend

die Funktion eines Gens im zellulären Kontext untersucht werden (Hammond, 2005; Moffat and Sabatini, 2006; Ngo, et al., 1998).

Die ersten genomweiten Studien zur Charakterisierung von Tumorsuppressoren mittels siRNA-Bibliotheken in immortalisierten Säugertierzellen wurden von (Westbrook, et al., 2005) und (Kolfshoten, et al., 2005) durchgeführt. In Zellkulturexperimenten wurden die Transkriptionsfaktoren Hmga2, Snail, Twist und Slug charakterisiert, deren Überexpression mit dem Transformationsstatus der Zellen korreliert (Kurrey, et al., 2005; Malek, Stelniec, et al., 2009 eingereicht}. Die Expression dieser Transkriptionsfaktoren ist in Patientenproben nachgewiesen und wird als Marker für das Invasionspotential und für die damit verbundenen schlechten Überlebensprognosen der Patienten verwendet (Belge, et al., 2008; Chiappetta, et al., 2008; Hotz, et al., 2007; Jethwa, et al., 2008; Motoyama, et al., 2008). Mittlerweile wird die RNA-Interferenz in Mausmodellen mit Erfolg erprobt. Die Anwendung von siRNA-Konstrukten gegen den Transkriptionsfaktor Hmga2 führte im Mausmodell für Ovarialtumore zu einer Wachstumshemmung und somit zur Reduktion der Tumormasse im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Malek, et al., 2008). Die Wirksamkeit der RNA-Interferenz konnte auch in klinischen Studien bei Patienten mit chemotherapieresistenten Leukämien nachgewiesen werden (Koldehoff, et al., 2007).

Die Analyse von potentiellen therapeutischen Markern in der Zellkultur gibt somit Anhaltspunkte für weitere Studien und wird zum Beispiel in Screening-Verfahren eingesetzt, um den Tumorgrad und den Tumortyp zu klassifizieren. Diese Bestimmung erhöht die richtige Wahl der Therapie und somit die Chancen von Patienten positiv darauf anzusprechen (Salvesen, et al., 2009).

1.5 Ziele der Arbeit

Voraussetzung für diese Arbeit ist ein hinsichtlich Phänotyp und Transkriptom gut charakterisiertes Modellsystem für Ovarialkarzinome, das Rose Zellsystem (Rose 199 und Rose A2/5 Zellen). In diesem Modell ist die chronische Aktivierung des KRAS/MAPK-Signaltransduktionssystems Auslöser der malignen Transformation und Änderung des genetischen Programms. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1) Welche Rolle spielen hoch regulierte Transkriptionsfaktoren in der neoplastischen Transformation phänotypisch normaler Ovarialepithelzellen durch mutiertes KRAS?

Zur Klärung dieser Frage wird zunächst die Expression ausgewählter Transkriptionsfaktoren mittels RNA-Interferenz transient in KRAS-transformierten Rose A2/5 Zellen unterdrückt und anschließend die Auswirkungen auf die Proliferation in adhärenter Kultur (2D), die ankerunabhängige (3D) Proliferation und die Ausprägung der EMT untersucht.

2) In welchem Umfang beeinflussen differentiell exprimierte Transkriptionsfaktoren das genetische Programm in KRAS-transformierten Zellen?

Dazu werden Genexpressionsprofile der KRAS-transformierten Zellen mit solchen Zellen verglichen, in denen die Expression einzelner Transkriptionsfaktoren unterdrückt wurde. Zielgene werden als reguliert eingestuft, wenn die jeweilige Genabschaltung durch siRNA die KRAS-induzierten Änderungen des Transkriptoms teilweise oder vollständig rückgängig macht.

3) Inwieweit beeinflussen sich die Transkriptionsfaktoren gegenseitig?

Zur Beantwortung dieser Frage werden die Expressiondaten aus den RNA-Interferenzversuchen mit dem mRNA- und Proteinspiegeln der Transkriptionsfaktoren verglichen. Experimentelle Daten werden mit einem mathematischen Modell korreliert (Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Legewie und Dr. Nils Blüthgen)

4) Inwieweit beeinflussen die Transkriptionsfaktoren im Netzwerk die zytoplasmatische Signaltransduktion unterhalb des molekularen Ras-Schalters?

Diese Frage wird mit Hilfe des mathematischen Modells untersucht und mit experimentellen Daten zum Aktivierungszustand der Signalkinasen abgeglichen.

2 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von differenziell exprimierten Transkriptionsfaktoren zwischen Rose 199 Zellen und deren KRAS-transformierten Derivaten, Rose A2/5 Zellen, untersucht werden. Das erste Ziel dieser Arbeit bestand daher darin, aus 51 hochregulierten Transkriptionsfaktoren in Rose A2/5 Zellen, eine reduzierte Anzahl für weitere Untersuchungen zu selektieren. Die Überexpression der 51 Transkriptionsfaktoren in Rose A2/5 Zellen im Vergleich zu Rose 199 Zellen wurde mittels Affymetrix-Analysen ermittelt, die in Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Schäfer generiert wurden (Tab. 1).

Tab. 1 Liste der differenziell exprimierten Transkriptionsfaktoren im Rose Zellsystem.

Daten der Affymetrix-Analysen erstellt in der Arbeitsgruppe Molekulare Tumorphathologie von Prof. Schäfer. Rot: für weitere Analysen ausgewählte Transkriptionsfaktoren. (*): Überexpression in Rose A2/5 Zellen im Vergleich zu Rose 199 Zellen.

Name	Identifikation	xfache Überexpression (*)	Name	Identifikation	xfache Überexpression (*)
Fosl1	U24154	46,47	Zfp455	U67083	2,68
Hmga2	AF261719	43,21	Ppard	U40064	2,65
Otx1	S81924	22,77	Cebpg	X64403	2,57
Sharp-1	AF009329	14,26	E2f5	U31668	2,17
Klf6	AF001417	13,51	JunB	X54686	2,10
Foxa1	X55955	12,45	Hes3	D13418	2,09
Tfec	L08812	10,21	Hif1a	Y09507	1,97
Hnf1a	X54423	9,33	Pax8	X94246	1,83
TTF-2	Y11321	7,77	Gtf2a1	AF000943	1,82
Hoxa-5	L03556	6,82	Zfp180	U41164	1,80
TR4	L27513	6,31	Cnbp	D45254	1,79
Hoxc6	M37568	5,32	Hoxa2	M91802	1,75
Gfi1	L06986	4,75	Zfp148	U30381	1,71
Hivep2	D37951	4,54	Nupr1	AF014503	1,68
Bhlha15	U58279	4,53	Tef	S58745	1,63
Rfc1	AF030050	4,40	Nfix	AB012235	1,63
Zfp37	AF072439	4,13	Runx1	L35271	1,63
Klf10	U88630	4,08	Smad2	AB017912	1,49
Bmyc	Z38067	3,80	Crem	S66024	1,49
Ddit3	U30186	3,22	Arntl	AF015953	1,48
Krox20	U78102	3,19	Nab1	U17253	1,47
Top2a	Z19552	2,97	Gadd45a	L32591	1,45
Foxa3	AB017044	2,87	Stat6	AF055292	1,45
Prdm2	U17837	2,86	Ncl	M55017	1,43
Nfix	AB012234	2,84	Creb1	X14788	1,37
Shox2	AJ002259	2,80			

Die Auswahl von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1 und Gfi1 aus den 51 KRAS-abhängigen Transkriptionsfaktoren erfolgte nach folgenden, rationalen Kriterien: 1)

keine Expression in ausdifferenzierten Körperzellen, 2) bekanntes Vorkommen in mehreren Tumortypen, 3) Vorhandensein von kommerziellen Antikörpern, um Proteinanalysen durchführen zu können (Tab. 1). Aufgrund der Relevanz in der Tumorentwicklung erfolgte zusätzlich die Auswahl des Transkriptionsfaktors RelA, aus der NF-kappaB-Familie, obwohl dieser Faktor im Rose Zellsystem nicht reguliert war (Lerebours, et al., 2008; Lin, et al., 2009). Für den Transkriptionsfaktor RelA ist jedoch eine post-translationale Aktivierung aus anderen Zellsystemen bekannt (Madrid, et al., 2000).

Während die Transkriptionsfaktoren Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA im Rose Zellsystem noch nicht untersucht wurden, existierten für Hmga2 und Fosl1 bereits Vorarbeiten, die deren partielle Beteiligung an der Aufrechterhaltung des transformierten Status von Rose A2/5 Zellen zeigen (Tchernitsa, et al., 2004); Malek, Stelniec, et al., 2009 eingereicht).

2.1 Expression von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA im Rose Zellsystem

Für die geplanten, funktionellen Analysen mittels RNA-Interferenz, war es zunächst von Bedeutung, die differenzielle Expression von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA im Rose Zellsystem zu bestätigen (Abb. 5).

Wie man den RT-PCR- und Western Blot-Analysen entnehmen kann, waren die Transkriptionsfaktoren Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1 und Gfi1 in Rose A2/5 Zellen im Vergleich zu Rose 199 Zellen stärker exprimiert und konnten dadurch für weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden (Abb. 5A, Abb. 5B).

Für den Transkriptionsfaktor RelA existierten keine Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen Rose 199 und Rose A2/5 Zellen, wie die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen zeigen (Abb. 5A). Im Gegensatz dazu ergaben die durchgeführten Western Blot-Analysen, dass das RelA-Protein in Rose A2/5 Zellen überexprimiert war, was auf eine post-translationale Regulation dieses Faktors hindeutete (Abb. 5B).

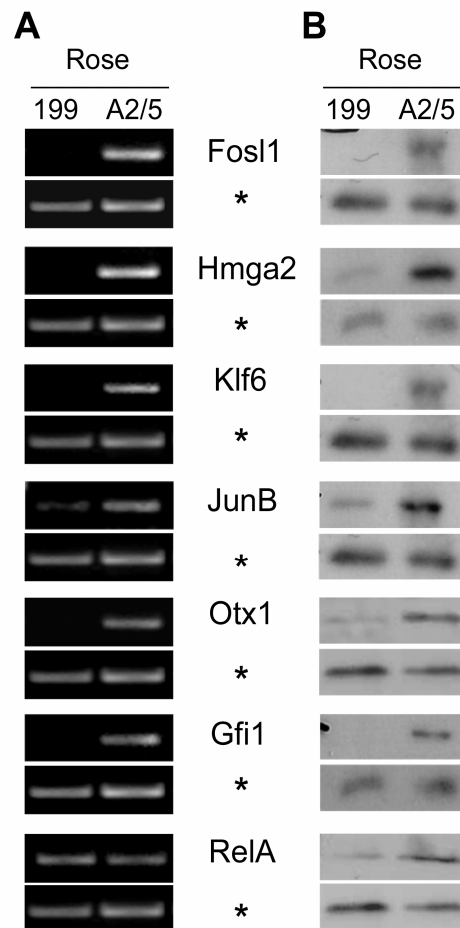


Abb. 5 Expression der Transkriptionsfaktoren im Rose Zellsystem.

A: RT-PCR-Analysen: Nachweis der mRNA-Expression von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1, RelA und Gapdh durch RT-PCR mit Gesamt-RNA aus Rose A2/5 und Rose 199 Zellen nach Auftrennung der Proben im 1-1,5%-igen Agarosegel. (*): Endogene Kontrolle Gapdh. **B: Western Blot-Analysen:** Nachweis der Proteinspiegel von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA mittels primärer Antikörper im Western Blot nach SDS-PAGE mit je 30-60 µg der Kernproteine aus Rose 199 und Rose A2/5 Zellen. (*): Ladekontrolle Histon H3.

2.2 Transienter Knock-down mittels RNA-Interferenz

Die Untersuchungen der Funktion von Transkriptionsfaktoren in Rose A2/5 Zellen erfolgten mittels RNA-Interferenz (Knock-down). Dadurch lässt sich die Menge der Ziel-mRNA und die des kodierten Proteins drastisch reduzieren (Hammond, 2005; Moffat and Sabatini, 2006; Ngo, et al., 1998).

Weil die Effizienz eines Knock-downs von verschiedenen Faktoren, wie der Anzahl der Transfektionen, dem siRNA-Duplex und der Konzentration von verwendeten Reagenzien abhängig ist, mussten zuerst die optimalen Bedingungen erarbeitet werden. Um mögliche Off-target-Effekte weitgehend auszuschließen, erfolgte der Knock-down jedes Transkriptionsfaktors mit zwei unabhängigen siRNA-Duplexen.

Als interne Kontrolle diente ein siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (scrambled, Sc), der kein endogenes Target besitzt.

Die Ermittlung des optimalen Zeitpunkts für die maximale mRNA-Reduktion erfolgte nach Erstellung einer Kinetik (24-96 h), mit der die Dauer und die Effizienz der einzelnen Knock-downs bestimmt wurden (Abb. 6).

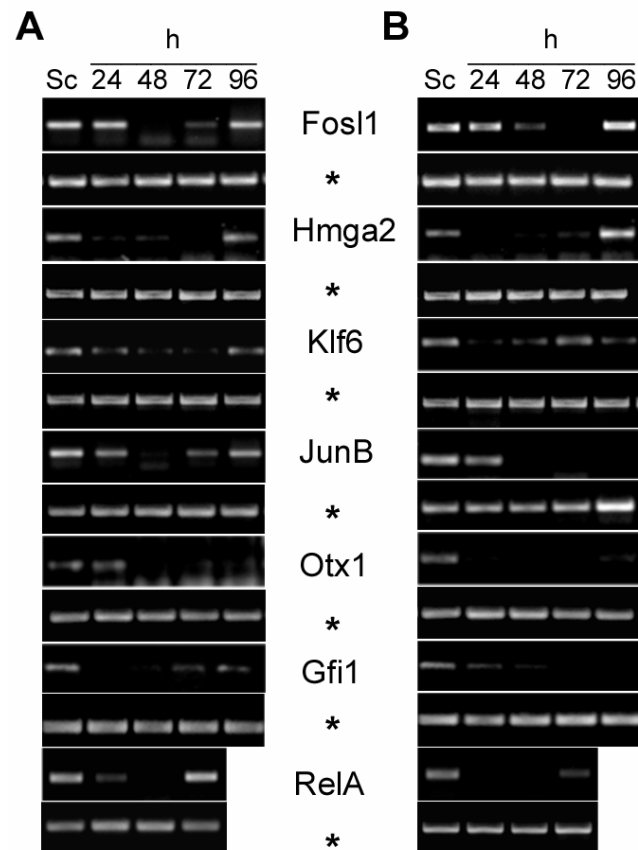


Abb. 6 Kinetik der mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren nach deren Knock-down in Rose A2/5 Zellen.

RNA-Interferenz: Die Transfektionen in Rose A2/5 Zellen erfolgten jeweils 24 h und 48 h nach dem Ausplattieren mit siRNA-Duplexen gegen Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte 24-96 h nach den Transfektionen. RT-PCR-Analysen: Nachweis der mRNA-Expression von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1, RelA und Gapdh durch RT-PCR mit Gesamt-RNA aus Rose A2/5 Zellen nach Auftrennung der Proben im 1-1,5%-igen Agarosegel. (*): endogene Kontrolle Gapdh. Interne Kontrolle: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc). (A); (B): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Die maximale Reduktion der mRNA-Menge lag zwischen 24-72 h nach den Transfektionen und variierte erwartungsgemäß in Abhängigkeit vom verwendeten siRNA-Duplex (Abb. 6). Die Zeitspanne in der Wirkungsweise von unabhängigen siRNA-Duplexen hängt von ihrem Bindungsort auf der Ziel-mRNA ab. Je nach Konformation der mRNA sind bestimmte Abschnitte für eine Bindung leichter bzw.

schwerer zugänglich, was entscheidend für die Effektivität eines Knock-downs ist (Shao, et al., 2007).

Die Dauer der Knock-downs war mit 72-96 h nach den erfolgten Transfektionen relativ kurz (Abb. 6). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die schnelle Teilungsgeschwindigkeit der Rose A2/5 Zellen sein, da bei jeder Teilung die Konzentration der siRNA-Duplexe verdünnt wird. Dagegen spricht jedoch, dass bei ähnlich schnell wachsenden HeLa-Zellen von einer Stabilität des transienten Knock-downs von bis zu zwei Wochen berichtet wird (Bartlett and Davis, 2007). Der erhöhte Verbrauch von siRNA-Duplexen lag daher im vorliegenden Fall eher an der schnellen Nachproduktion der Ziel-mRNA-Menge bedingt durch die kontinuierliche Aktivierung von KRAS. Zum Zeitpunkt von 48 h nach den Transfektionen war die mRNA-Menge aller Transkriptionsfaktoren im Vergleich zu der Sc-Kontrolle deutlich reduziert (Abb. 6).

Ziel eines siRNA-Knock-downs ist die Reduktion des kodierten Proteins, wodurch Rückschlüsse auf die Funktion ermöglicht werden. Abhängig von den Halbwertszeiten des Proteins kann sich der Zeitpunkt der maximalen Reduktion von dem Zeitpunkt der maximalen Reduktion der Ziel-mRNA unterscheiden. Aus diesem Grund wurde die Effizienz der Proteinreduktion nach einzelnen Knock-downs zum ausgewählten Zeitpunkt von 48 h überprüft (Abb. 7).

Wie die RT-PCR- und Western Blot-Analysen nach jedem Knock-down der Transkriptionsfaktoren zeigen, waren die Ziel-mRNA und das zugehörige Protein deutlich reduziert (Abb. 7A, Abb. 7B).

Aus den densitometrischen Analysen der Western Blot-Ergebnisse resultiert, dass die Reduktion der einzelnen Transkriptionsfaktor-Proteine zwischen 77 % (RelA) und 99,5 % (Klf6) betrug (Abb. 7C). Somit ergaben alle siRNA-Duplexe akzeptable Effekte und konnten in weiteren Analysen eingesetzt werden.

2.3 Untersuchungen zur funktionellen Rolle der Transkriptionsfaktoren in Rose A2/5 Zellen

Der Prozess der EMT invasiver Tumore beinhaltet eine morphologische Änderung der Zellen vom epithelialen zum mesenchymalen Zelltyp. *In vitro* ist die Morphologie von Zellen ein Korrelat für deren Invasivität und stellt daher ein wichtiges Kriterium bei Analyse der Tumoreigenschaften dar.

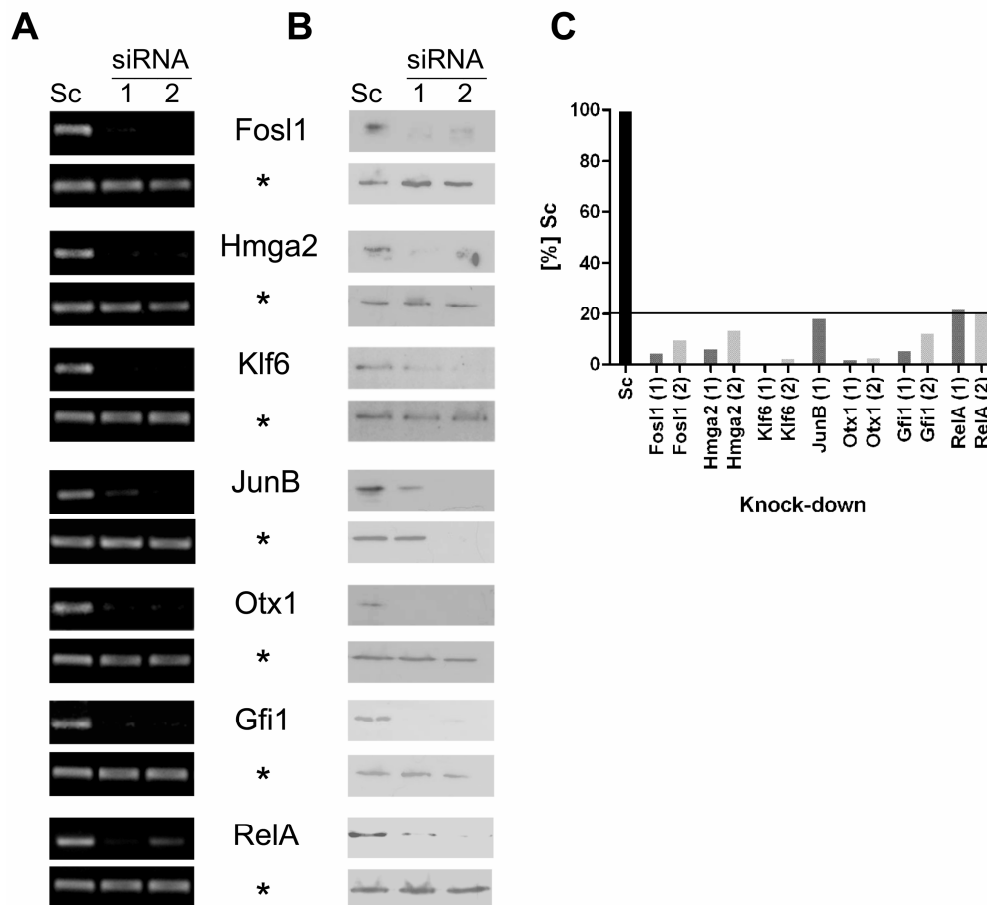


Abb. 7 Vergleich der mRNA- und Proteinspiegel der Transkriptionsfaktoren nach deren Knock-down in Rose A2/5 Zellen.

Transfektionen der Zellen siehe Abb. 6. Die Isolierung der Gesamt-RNA und der Kernproteine erfolgte 48 h nach den Transfektionen. A: RT-PCR-Analysen: Nachweis der mRNA-Expression von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA (siehe Abb. 6). B: Western Blot-Analysen: Nachweis der Proteinspiegel von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA mittels primärer Antikörper im Western Blot nach der SDS-PAGE mit je 30-60 µg der Kernproteine aus Rose A2/5 Zellen. (*): Ladekontrolle β-Tubulin. C: Densitometrische Analyse der Western-Blot-Ergebnisse, prozentual auf Sc berechnet. Interne Kontrolle: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc). (1); (2): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Ein weiteres Kriterium ist die Fähigkeit zur uneingeschränkten, ankerabhängigen (2D) Proliferation. Die malignen Tumorzellen zeigen zudem die Eigenschaft zur Proliferation ohne eine Verankerung an die Oberfläche, ankerunabhängige (3D) Proliferation. Diese Eigenschaft beruht auf der Fähigkeit von Tumorzellen ihre eigene Matrix so zu verändern, dass eine Mobilität möglich wird (Hoffman, et al., 1993; Oberhuber, et al., 1995; Sers, et al., 2002).

Die Charakterisierung der Effekte der Transkriptionsfaktoren auf die neoplastische Transformation von Rose A2/5 Zellen erfolgte deshalb über die Untersuchung der Morphologie und Ankerunabhängigkeit. Als Positivkontrolle diente die Anwendung

des kommerziellen Mek1/2-Inhibitors U0126, der den Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg inhibiert, welcher hauptsächlich den Transformationsstatus der Rose A2/5 Zellen aufrechterhält (Tchernitsa, et al., 2004).

2.3.1 Einfluss auf die zelluläre Morphologie

Die Zugabe des Mek1/2-Inhibitors U0126 zu Rose A2/5 Zellen resultierte in einer morphologischen Reversion des transformierten Phänotyps, die mit dem Verlust der spindelförmigen Form und einer stärkeren Ausbreitung der Zellen an der Oberfläche einherging. Dadurch entstand ein epithelial-ähnlicher Phänotyp, der dem der Rose 199 Zellen ähnelte (Abb. 8).

Diese Ergebnisse stimmten mit den bereits publizierten Daten zum Einfluss des Mek1-Inhibitors PD98059 überein. Die unterschiedliche Morphologie der Rose 199 und Rose A2/5 Zellen (Abb. 8, Abb. 9, Sc, Mock) wurde bereits beschrieben (Tchernitsa, et al., 2004).

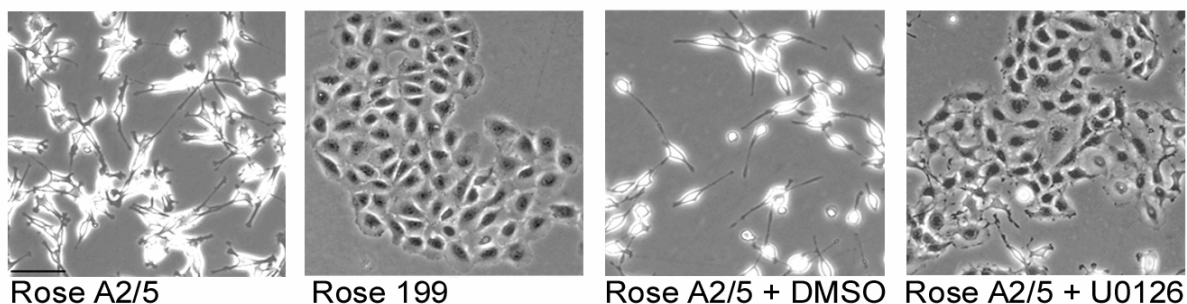


Abb. 8 Einfluss des Mek1/2-Inhibitors U0126 auf die Morphologie der Rose A2/5 Zellen.
Zugabe des Inhibitors: Die Zugabe des U0126-Inhibitors (10 μ M) und die der äquivalenten Menge an DMSO (in μ l) zu Rose A2/5 Zellen erfolgte 24 h nach dem Ausplattieren.
Morphologische Analyse: Die Untersuchung der Morphologie erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskops 72 h nach dem Ausplattieren der Zellen. Zum Vergleich ist die Morphologie der unbehandelten Rose 199 und Rose A2/5 Zellen dargestellt. 457fache Vergrößerung.

Die Bestimmung des Einflusses von Fos1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA auf die Morphologie der Rose A2/5 Zellen erfolgte 48 h nach den Transfektionen.

In Abbildung 9 ist die Morphologie der Zellen dargestellt. Jeder Knock-down resultierte in einem partiellen Verlust der spindelförmigen, mesenchymal-ähnlichen Morphologie der Rose A2/5 Zellen. Verglichen mit den Effekten des U0126-Inhibitors waren diese Effekte im Allgemeinen jedoch viel weniger deutlich ausgeprägt (Abb. 8, Abb. 9).

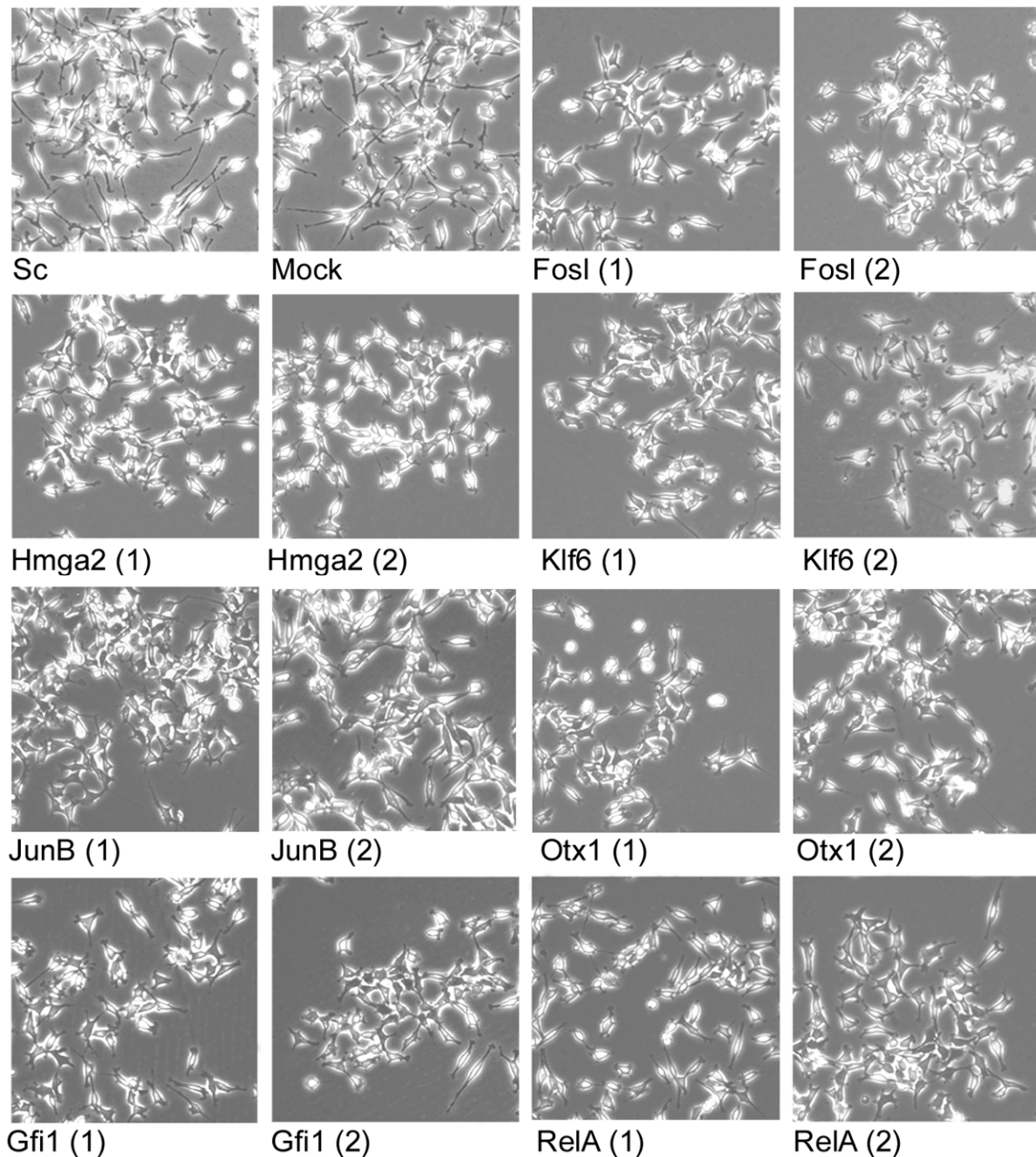


Abb. 9 Einfluss der Knock-downs von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA auf die Morphologie der Rose A2/5 Zellen.

Transfektionen der Zellen siehe Abb. 6. Morphologische Analyse: Die Untersuchung der Morphologie erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskops 48 h nach den Transfektionen. 457fache Vergrößerung. Interne Kontrollen: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc), Zellen mit Transfektionsreagenz (Mock). (1); (2): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Aus der morphologischen Analyse ließ sich die Aussage treffen, dass alle untersuchten Transkriptionsfaktoren partiell zur Entstehung des transformierten Phänotyps der Rose A2/5 beitrugen.

Die RT-PCR-Analysen der Expression von E-cadherin unterstützen diese Ergebnisse. E-cadherin ist das wichtigste zelluläre Adhäsionsmolekül in epithelialen

Zellen. Seine Reaktivierung weist auf die Reversion der EMT und somit den Verlust der Invasivität von Tumorzellen hin. Eine Reaktivierung von E-cadherin-Expression in Rose A2/5 Zellen war nach keinem der hier durchgeführten Knock-downs nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

2.3.2 Einfluss auf die Proliferation

Die Analysen der Proliferation erfolgten mittels alamarBlue- und XTT-Tests. Mit dem alamarBlue-Test ist eine kontinuierliche Messung möglich. Der Vorteil des XTT-Tests besteht darin, dass durch die punktuelle Zugabe die gemessenen Werte genauer sind und dadurch direkt mit der Zellzahl, ermittelt in einer konventionellen Zellzählung, korrelieren (Abb. 10). Für die ankerabhängige (2D) Proliferation wurde Zellkulturplastik als Oberfläche verwendet. Für die ankerunabhängige (3D) Proliferation wurde die Oberfläche mit dem Polymer PolyHEMA beschichtet, was das Anheften der Zellen verhindert.

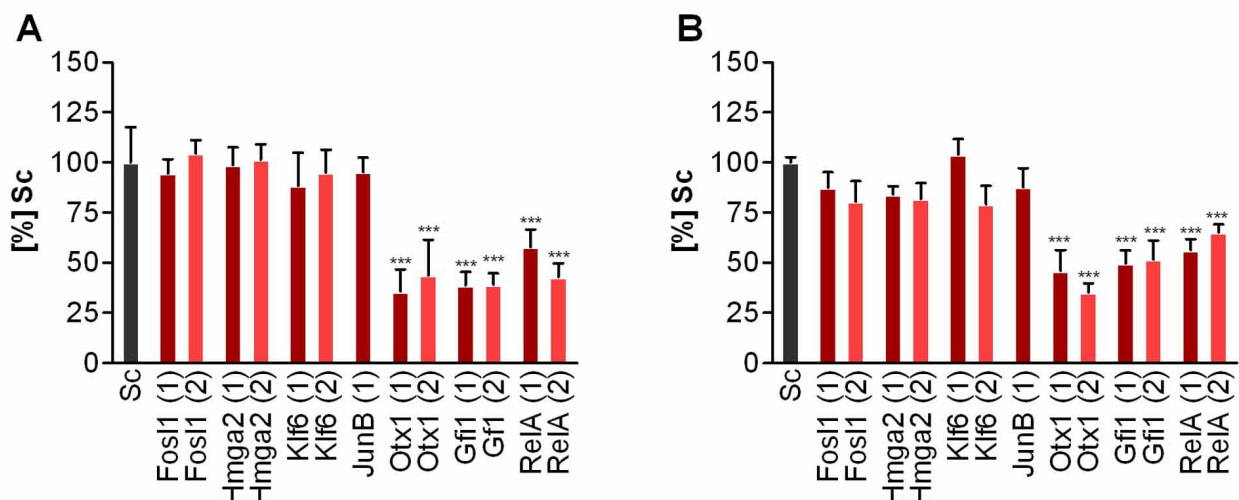


Abb. 10 Vergleich der konventionellen Zellzählung mit XTT-Analysen.

Transfektion der Zellen siehe Abb. 6. A: Zellzahlbestimmung: Die manuelle Auszählung der vitalen Zellen nach Trypanblaufärbung erfolgte 48 h nach den Transfektionen. Mittelwerte mit SD aus zwei bis drei unabhängigen Versuchen mit je drei Replika, prozentual auf die Sc-Kontrolle bezogen. B: XTT-Test: Ankerabhängige (2D) Proliferation der Rose A2/5 Zellen 48 h nach der zweiten Transfektion (Daten aus Abb. 13, Abb. 14). * Signifikanz von $P \leq 0,05$; ** Signifikanz von $P \leq 0,01$; *** Signifikanz von $P \leq 0,001$. Interne Kontrolle: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc). (1); (2): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

2.3.2.1 Proliferation der unbehandelten Rose 199 und Rose A2/5 Zellen

Da das Proliferationsverhalten der Rose 199 und Rose A2/5 Zellen schon gut charakterisiert ist, erfolgte der Vergleich der beiden Tests an diesen Zellen (Tchernitsa, et al., 2004). Wie die Proliferationsanalysen zeigen, waren die Ergebnisse aus beiden Tests gut miteinander vergleichbar (Abb. 11). Erwartungsgemäß wies die ankerabhängige (2D) Proliferation der Rose 199 und Rose A2/5 Zellen keine signifikanten Unterschiede auf. Die Fähigkeit zur ankerunabhängigen (3D) Proliferation zeigten nur die KRAS-transformierten Rose A2/5 Zellen (Abb. 11).

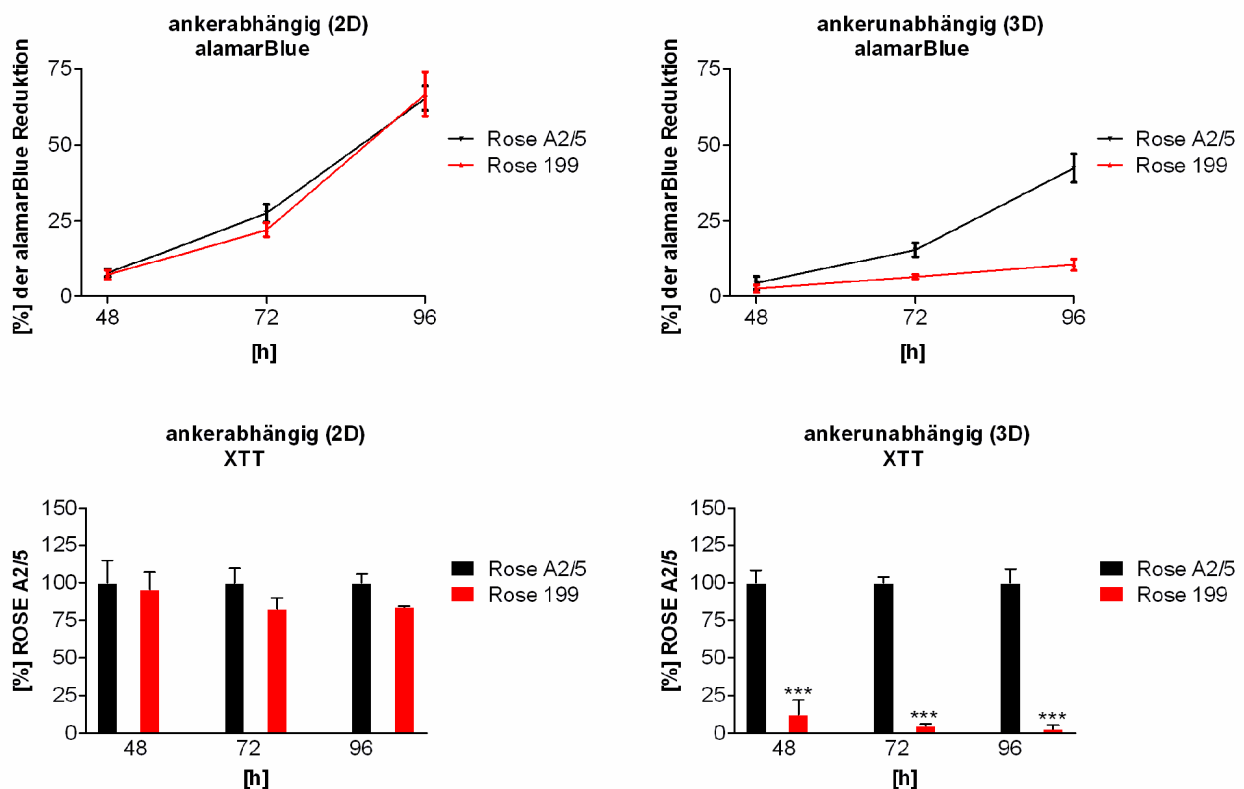


Abb. 11 Ankerabhängige (2D) und ankerunabhängige (3D) Proliferation der Rose 199 und Rose A2/5 Zellen.

Proliferationsmessung: Die Zugabe der XTT-Substanz erfolgte täglich beginnend 20 h nach dem Ausplattieren der Zellen und die der alamarBlue-Substanz einmalig nach 4 h. Die Absorptionsmessungen wurden täglich 48-96 h nach dem Ausplattieren durchgeführt. Ankerabhängig (2D): Proliferation auf Zellkulturplastik. Ankerunabhängig (3D): Proliferation auf PolyHEMA. Dargestellt wurden Mittelwerte aus drei Replika mit SD. AlamarBlue-Test: Prozentuale Reduktion der alamarBlue-Substanz. XTT-Test: Proliferation, prozentual auf die Rose A2/5 Zellen bezogen. * Signifikanz von $P \leq 0,05$; ** Signifikanz von $P \leq 0,01$; *** Signifikanz von $P \leq 0,001$.

2.3.2.2 Proliferation der Rose A2/5 Zellen nach Zugabe des U0126-Inhibitors

Nach Zugabe des U0126-Inhibitors wurde eine starke Hemmung der ankerunabhängigen (3D) Proliferation der Rose A2/5 Zellen erwartet, ähnlich den Effekten nach Zugabe des Mek1-Inhibitors PD98059 (Tchernitsa, et al., 2004). Die Analyse der Messungen zeigte, dass nicht nur die ankerunabhängige (3D) sondern auch die ankerabhängige (2D) Proliferation der Rose A2/5 nach Zugabe des U0126-Inhibitors signifikante Unterschiede im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle aufwies (Abb. 12). Die uneingeschränkte, ankerabhängige (2D) Proliferation ist ebenfalls ein Merkmal nicht-transformierter Tumorzellen.

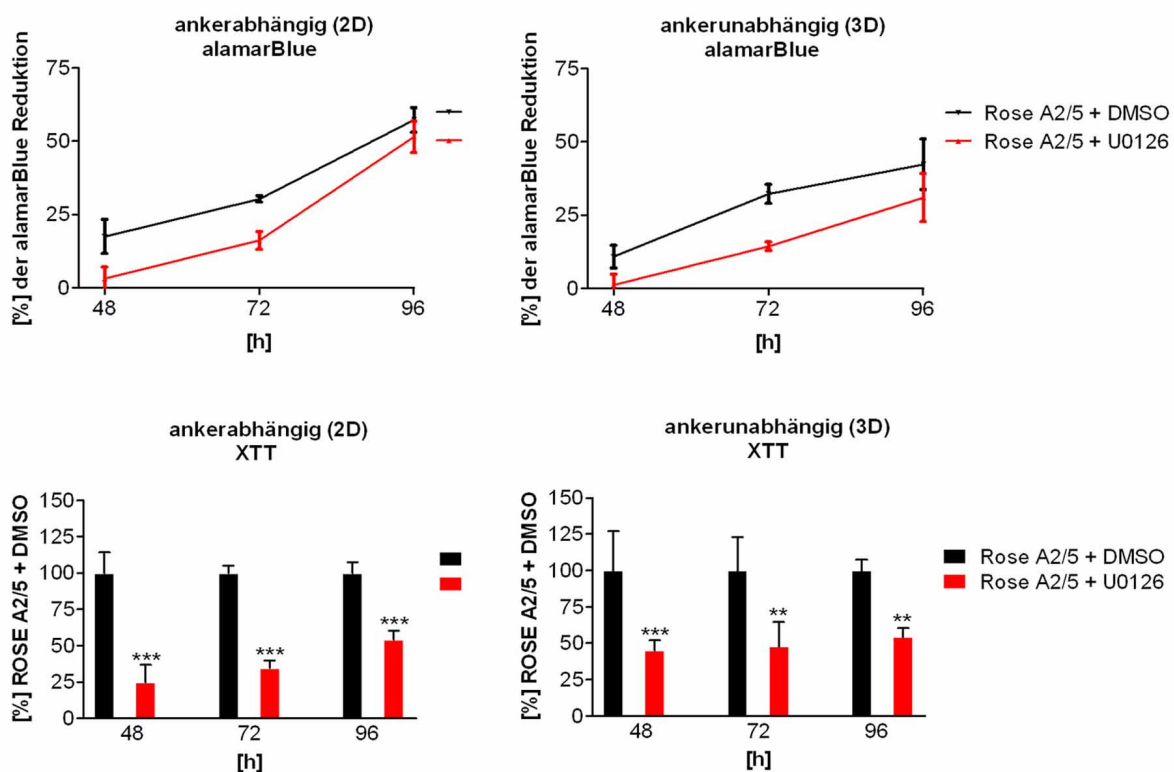


Abb. 12 Einfluss des Mek1/2-Inhibitors U0126 auf die ankerabhängige (2D) und ankerunabhängige (3D) Proliferation der Rose A2/5 Zellen.

Zugabe des Inhibitors siehe Abb. 8. Proliferationsmessung: Die Zugabe der XTT-Substanz zu Rose A2/5 Zellen erfolgte täglich beginnend 44 h und die der alamarBlue-Substanz einmalig 28 h nach Ausplattieren. Die Absorptionsmessungen wurden täglich 48-96 h nach Ausplattieren der Zellen durchgeführt. Ankerabhängig (2D): Proliferation auf Zellkulturplastik. Ankerunabhängig (3D): Proliferation auf PolyHEMA. Mittelwerte aus drei Replika mit SD eines repräsentativen Experiments. AlamarBlue-Test: Prozentuale Reduktion der alamarBlue-Substanz. XTT-Test: Proliferation, prozentual auf die Rose A2/5 Zellen + DMSO bezogen. * Signifikanz von $P \leq 0,05$; ** Signifikanz von $P \leq 0,01$; *** Signifikanz von $P \leq 0,001$.

2.3.2.3 Proliferation der Rose A2/5 Zellen nach Knock-down von Fos1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA

Die Messung des Einflusses von Otx1, Gfi1 und RelA auf die Proliferation zeigte eine starke Hemmung der ankerabhängigen (2D) und ankerunabhängigen (3D) Proliferation (Abb. 13).

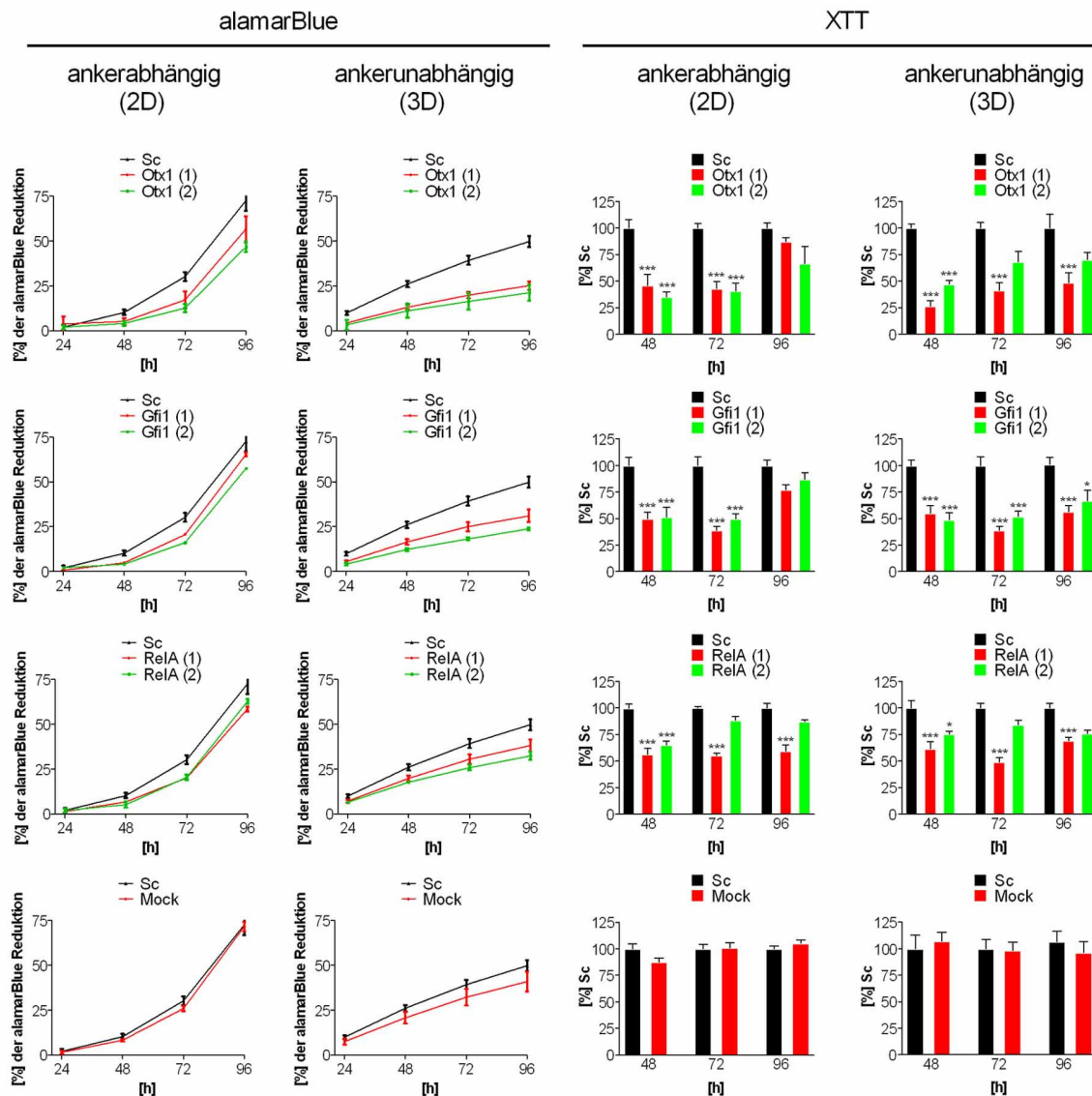


Abb. 13 Einfluss der Knock-downs von Otx1, Gfi1 und RelA auf die ankerabhängige (2D) und ankerunabhängige (3D) Proliferation von Rose A2/5 Zellen.

Transfektionen der Zellen siehe Abb. 6. Proliferationsmessung: Die Zugabe der XTT-Substanz zu Rose A2/5 Zellen erfolgte täglich beginnend 44 h und die der alamarBlue-Substanz einmalig 4 h nach den Transfektionen. Die Absorptionsmessungen erfolgten täglich 24-96 h bzw. 48-96 h nach Ausplattieren der Zellen. Ankerabhängig (2D): Proliferation auf Zellkulturplastik. Ankerunabhängig (3D): Proliferation auf PolyHEMA. AlamarBlue-Test: Mittelwerte aus drei Replika mit SD als prozentuale Reduktion der alamarBlue-Substanz eines repräsentativen Experiments. XTT-Test: Mittelwerte mit SEM aus zwei bis drei unabhängigen Versuchen mit je drei Replika prozentual auf die Werte der Sc-Kontrolle bezogen. * Signifikanz von $P \leq 0,05$; ** Signifikanz von $P \leq 0,01$; *** Signifikanz von $P \leq 0,001$. Interne Kontrollen: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc), Zellen mit Transfektionsreagenz (Mock). (1); (2): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Aufgrund der generellen (2D) Proliferationshemmung durch diese Faktoren, lässt sich die Aussage treffen, dass der Einfluss auf die ankerunabhängige (3D) Proliferation demnach nicht spezifisch war. Diese Effekte ähnelten denen nach Zugabe des U0126-Inhibitors, waren jedoch nicht so stark ausgeprägt (Abb. 12, Abb. 13). Die Mock- und Sc-Kontrollen zeigten keinen signifikanten Unterschied (Abb. 13). Im Gegensatz dazu beeinflussten die Knock-downs von Fosl1, Hmga2, Klf6 und JunB nur die ankerunabhängige (3D) Proliferation der Rose A2/5 Zellen (Abb. 14).

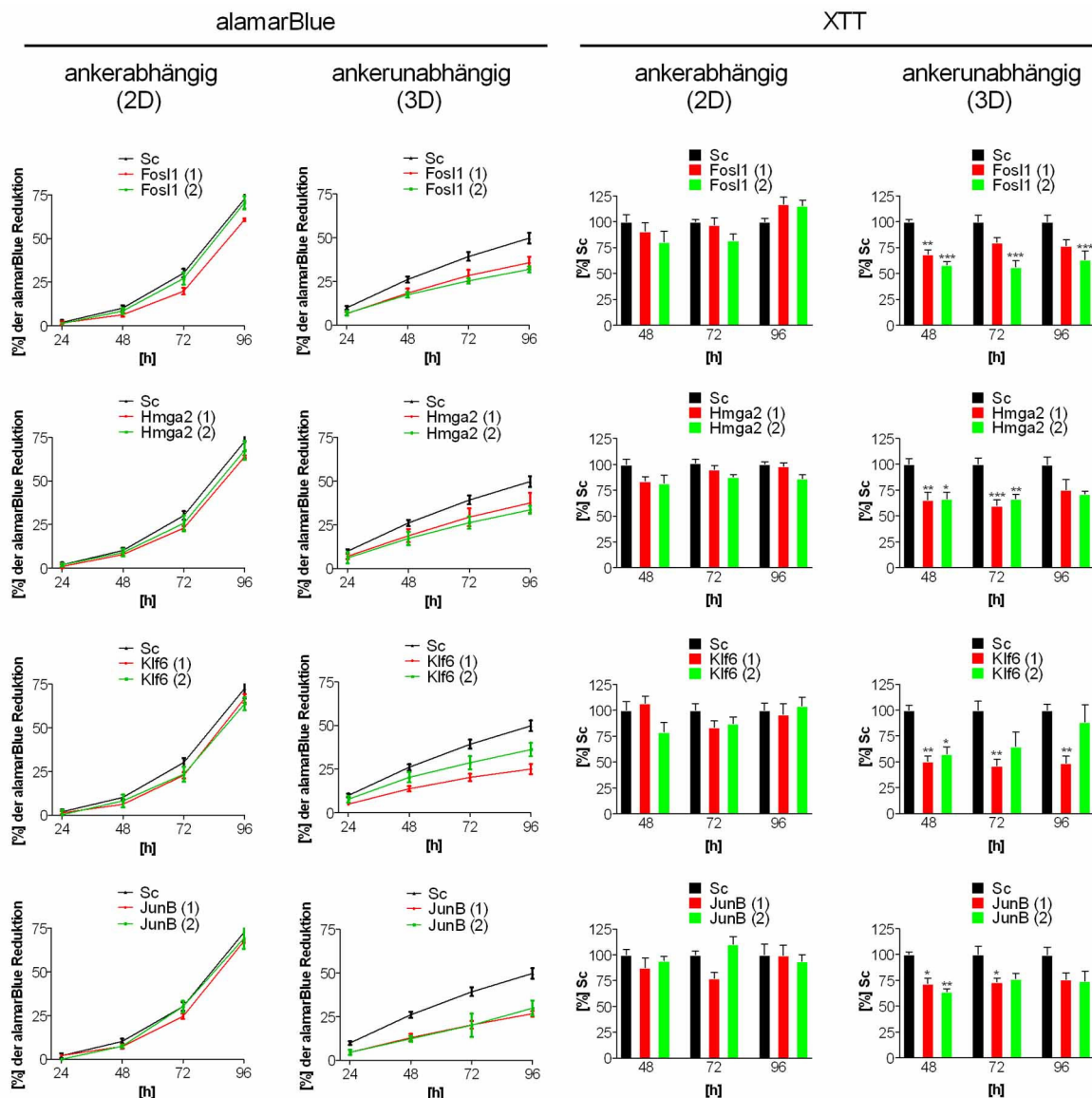


Abb. 14 Einfluss der Knock-downs von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB auf die ankerabhängige (2D) und ankerunabhängige (3D) Proliferation von Rose A2/5 Zellen. Transfektionen der Zellen siehe Abb. 6. Proliferationsmessungen: siehe Abb. 13. * Signifikanz von $P \leq 0,05$; ** Signifikanz von $P \leq 0,01$; *** Signifikanz von $P \leq 0,001$. Interne Kontrolle: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc). (1); (2): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Die vergleichende Darstellung im Scatter-Plot zeigt die zusammengefassten Ergebnisse aus den alamarBlue- und XTT-Proliferationstests (Abb. 15). Die Transkriptionsfaktoren lassen sich bezüglich der Effekte auf die ankerabhängige (2D) Proliferation in zwei funktionelle Gruppen aufteilen (Abb. 15, 2D, Gruppe 1 und 2). Die generelle Hemmung der ankerabhängigen (2D) Proliferation durch Otx1, Gfi1 und RelA resultierte in einer unspezifischen Hemmung der ankerunabhängigen (3D) Proliferation. Die Hemmung der ankerunabhängigen (3D) Proliferation durch Fosl1, Hmga2, Klf6 und JunB war dagegen spezifisch. Aus diesem Grund sind alle Transkriptionsfaktoren bezüglich der Effekte auf die ankerunabhängige (3D) Proliferation innerhalb einer Gruppe zu finden (Abb. 15, 3D, Gruppe 1).

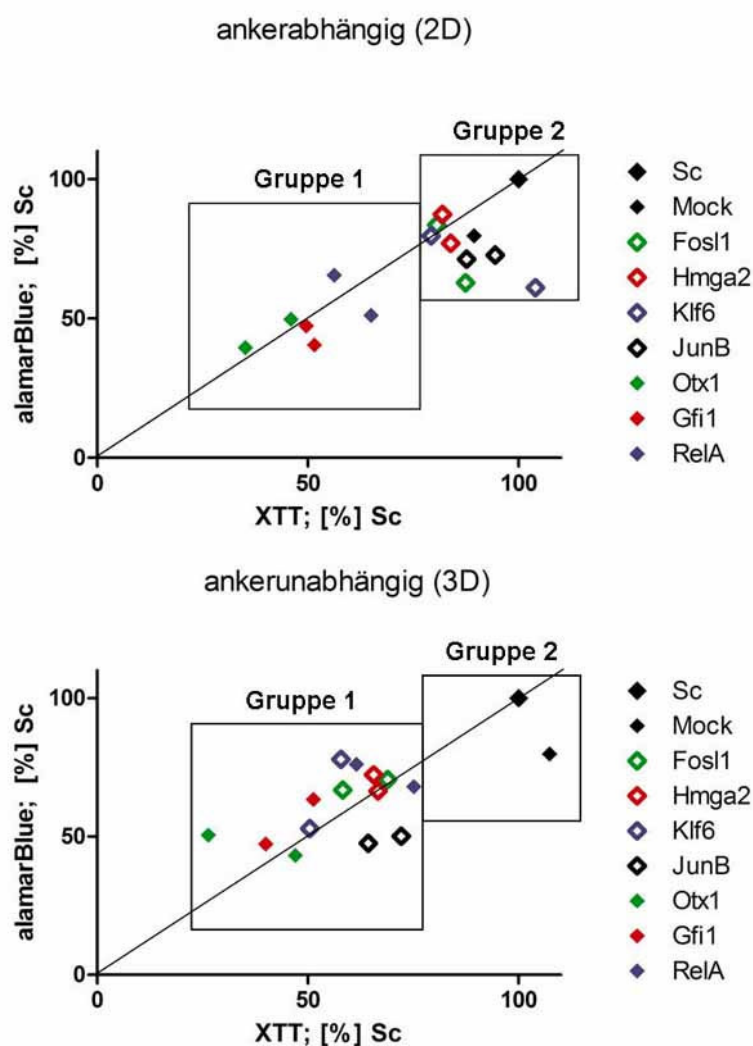


Abb. 15 Vergleich der Ergebnisse der alamarBlue- und XTT-Tests.

Scatter-Plot: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Proliferationstest zum Zeitpunkt von 48 h nach den Transfektionen (aus Abb. 13, Abb. 14). X-Achse: Ergebnisse der XTT-Analysen. Y-Achse: Ergebnisse der alamarBlue-Analysen. Interne Kontrollen: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc), Zellen mit Transfektionsreagenz (Mock). Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Die Transkriptionsfaktoren Otx1, Gfi1 und RelA haben somit eine signifikante Rolle bei der Aufrechterhaltung der Fähigkeit zur uneingeschränkten, ankerabhängigen (2D) Proliferation der Rose A2/5 Zellen, die auch ein Merkmal von nicht-transformierten Tumorzellen ist. Im Gegensatz dazu spielen die Transkriptionsfaktoren Fosl1, Hmga2, Klf6 und Junb ausschließlich eine Rolle bei dem Erhalt der Ankerunabhängigkeit (3D) der Rose A2/5 Zellen.

Für die Aufrechterhaltung der Proliferationsfähigkeiten der Rose A2/5 Zellen waren alle untersuchten Transkriptionsfaktoren von Bedeutung.

2.3.3 Einfluss auf die Zellzyklusregulation

Um die Wirkung der Proliferationshemmung zu verstehen, wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt.

Die Analyse der Verteilung von Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen erfolgte nach Färbung der DNA mit Propidiumjodid im Durchflusszytometer. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid ist ein DNA-interkalierendes Molekül, das stöchiometrisch an doppelsträngige DNA bindet. Die gefärbten Zellen können entsprechend den detektierten Fluoreszenzsignalen den Zellzyklusphasen zugeordnet werden. Dabei können folgende Zellzyklusphasen voneinander unterschieden werden: G0/G1: diploide Zellen mit einem Chromosomensatz von $1n$; G2: tetraploide Zellen mit einem Chromosomensatz von $2n$; und S: zwischen di- und tetraploiden Zellen mit einem Chromosomensatz zwischen $1n$ und $2n$. Im Sub-G0/G1 Peak stellen sich die Zellen der mittleren bis späten Phase der Apoptose dar, die sich aufgrund des geringeren DNA-Gehaltes noch vor den diploiden Zellen erscheinen.

2.3.3.1 Zellzyklusanalysen der Rose 199 und Rose A2/5 Zellen

Als Maßstab für den Einfluss eines Transkriptionsfaktors auf die Regulation des Zellzyklus, dienten erneut die Effekte des Inhibitors U0126 auf die Rose A2/5 Zellen. Die unbehandelten Rose 199 und Rose A2/5 Zellen stellten die Kontrollpopulationen dar (Abb. 16).

Wie die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen zeigen, existierten keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den unbehandelten Rose 199 und Rose A2/5 Zellen sowie den DMSO-Kontrollen. Im Gegensatz dazu verursachte die Zugabe des U0126-

Inhibitors eine Verschiebung der Rose A2/5 Zellen aus der S-Phase in die G0/G1- und G2/M-Phase (Abb. 16A, Abb. 16B).

Zusammen mit den Ergebnissen der Proliferationsanalysen ergibt sich hieraus, dass die spezifische Hemmung der ankerabhängigen (2D) und die damit zusammenhängende unspezifische Hemmung der ankerunabhängigen (3D) Proliferation der Rose A2/5 Zellen nach Zugabe des U0126-Inhibitors auf einen Zellzyklusarrest zurückzuführen ist (Abb. 11, Abb. 12, Abb. 16).

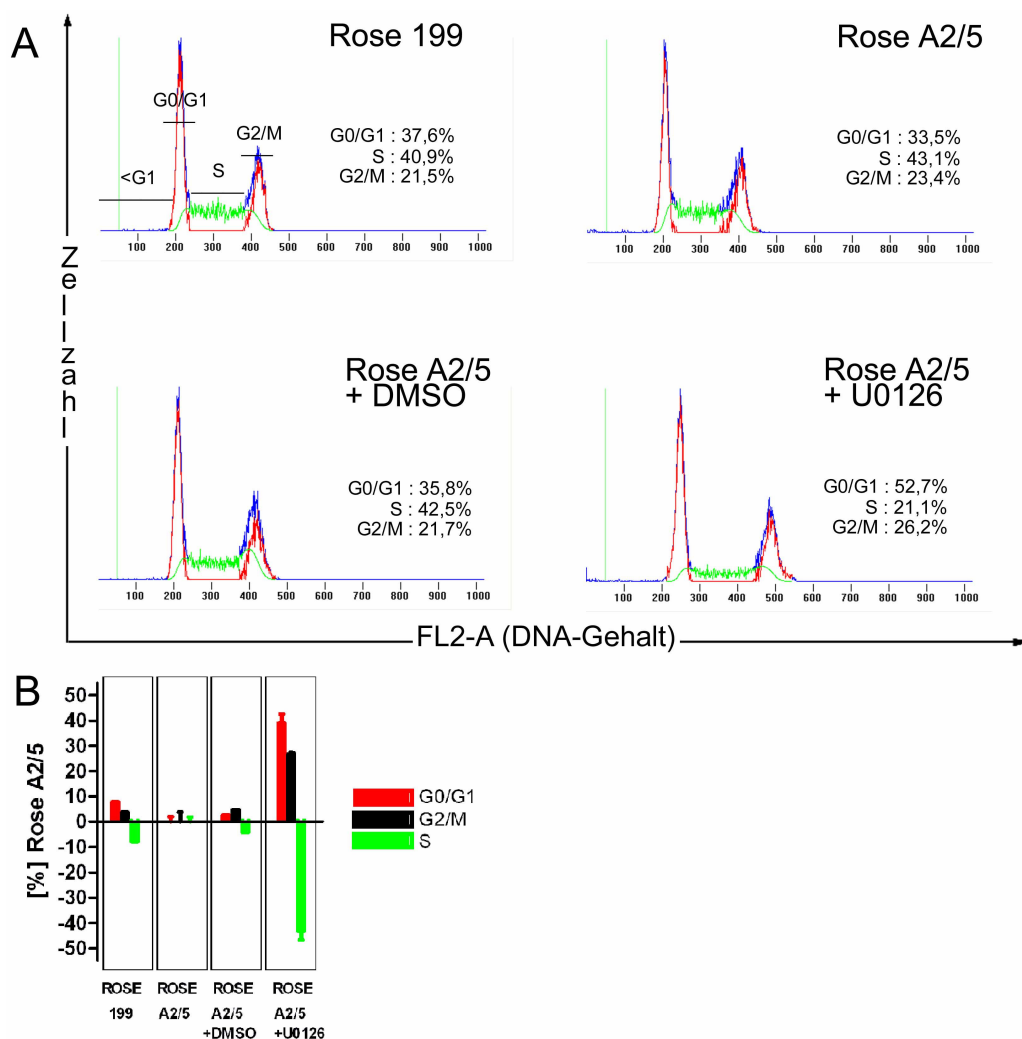


Abb. 16 Zellzyklusanalysen von Rose 199 und Rose A2/5 Zellen.

Zugabe des Inhibitors siehe Abb. 8. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen im 70%-igen Ethanol fixiert. Nach Färbung der Zellen mit Propidiumjodid erfolgte die Messung der Zellzyklusphasen im Durchflusszytometer. A: Zellzyklusanalysen: Y-Achse: Zellzahl. X-Achse: DNA-Gehalt. Rot: G0/G1- und G2/M-Peak. Grün: S-Phase. Blau: allgemeine Zellverteilung. Prozentuale Werte: Anzahl der Zellen einzelner Zellzyklusphasen. B: Vergleich der Ergebnisse: Mittelwerte mit SD aus zwei biologisch unabhängigen Messungen prozentual auf die Werte der einzelnen Zellzyklusphasen von Rose A2/5 Zellen bezogen. G0/G1-; die S- und die G2/M-Phase der Rose A2/5 Zellen entspricht 100 %. Rot: G0/G1-Phase. Grün: S-Phase. Schwarz: G2/M-Phase.

2.3.3.2 Zellzyklusanalysen der Rose A2/5 Zellen nach Knock-down von Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA

Die Untersuchungen des Einflusses der ausgewählten Transkriptionsfaktoren auf den Zellzyklus der Rose A2/5 Zellen erfolgten 48 h nach den Transfektionen (Abb. 17).

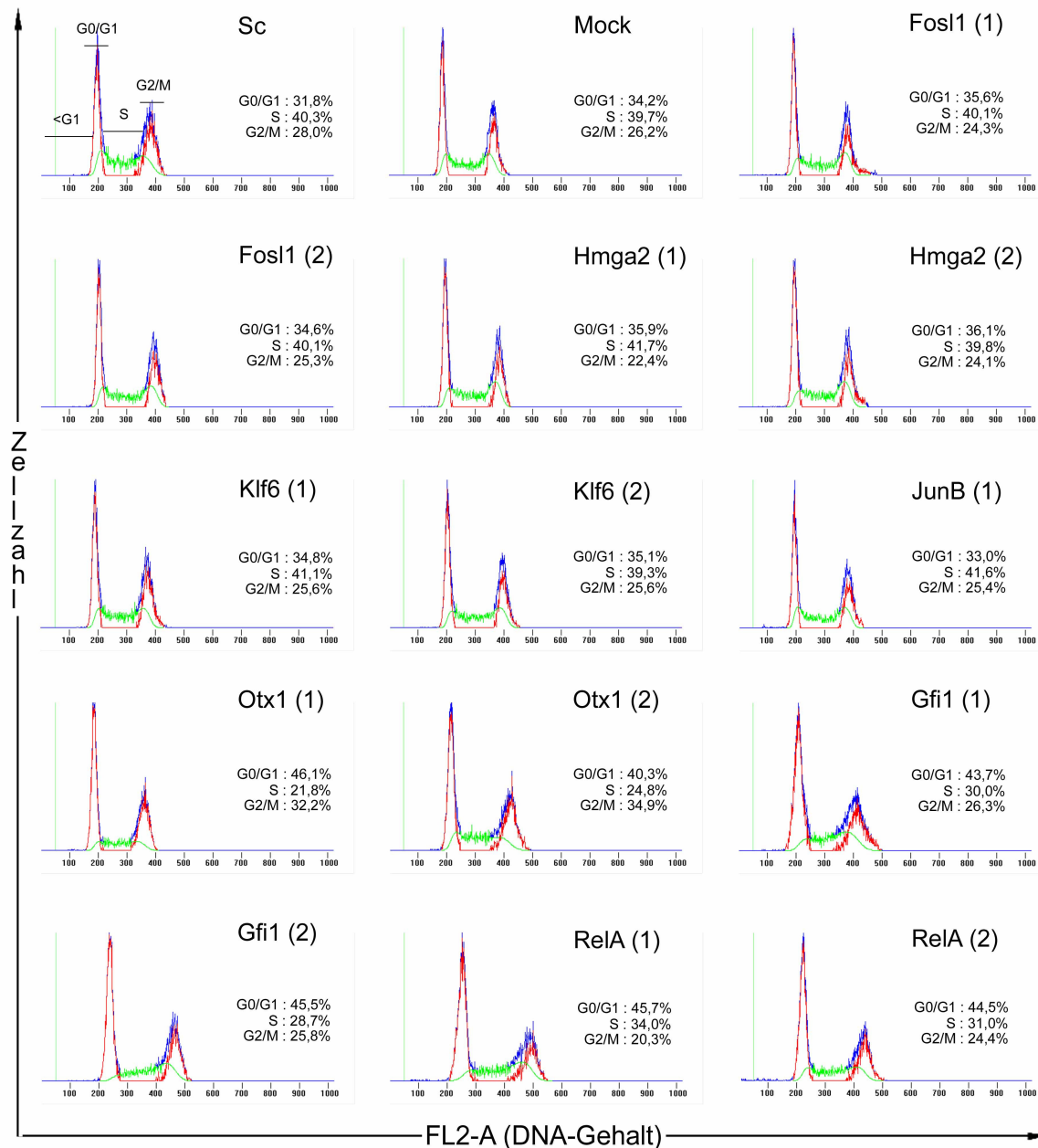


Abb. 17 Einfluss von Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA auf die Zellzyklusregulation.

Transfektionen der Zellen siehe Abb. 6. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen im 70%-igen Ethanol fixiert. Nach Färbung der Zellen mit Propidiumjodid erfolgte die Messung der Zellzyklusphasen im Durchflusszytometer. Zellzyklusanalysen: Y-Achse: Zellzahl. X-Achse: DNA-Gehalt. Rot: G0/G1- und G2/M-Peak. Grün: S-Phase. Blau: allgemeine Zellverteilung. Prozentuale Werte: Anzahl der Zellen einzelner Zellzyklusphasen. Interne Kontrollen: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc), Zellen mit Transfektionsreagenz (Mock). (1); (2): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Als Vergleich diente die Verteilung der Sc- und Mock-Kontrollpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen. Der Knock-down von Otx1, Gfi1 und RelA in Rose A2/5 Zellen bewirkte ihre Verschiebung aus der S-Phase in die G0/G1-Phase. Die Knock-downs von Fos11, Hmga2, Klf6 und JunB ergaben keine deutlichen Unterschiede in der Verteilung der Zellzyklusphasen (Abb. 17).

Da keine Erhöhung der apoptotischen Zellen ($< G1$) festgestellt wurde und zwischen den zwei Kontrollpopulationen Sc und Mock keine Unterschiede existierten, handelte es sich bei den Knock-down-Effekten von Otx1, Gfi1 und RelA auf Rose A2/5 Zellen demnach um eine spezifische Regulation des Zellzyklus (Abb. 17).

Die Normalisierung der Werte einzelner Zellzyklusphasen auf die entsprechende Sc-Kontrolle (Unterschiede in Y), ermöglichte eine vergleichende Darstellung der Ergebnisse aus biologisch unabhängigen Messungen (Abb. 18).

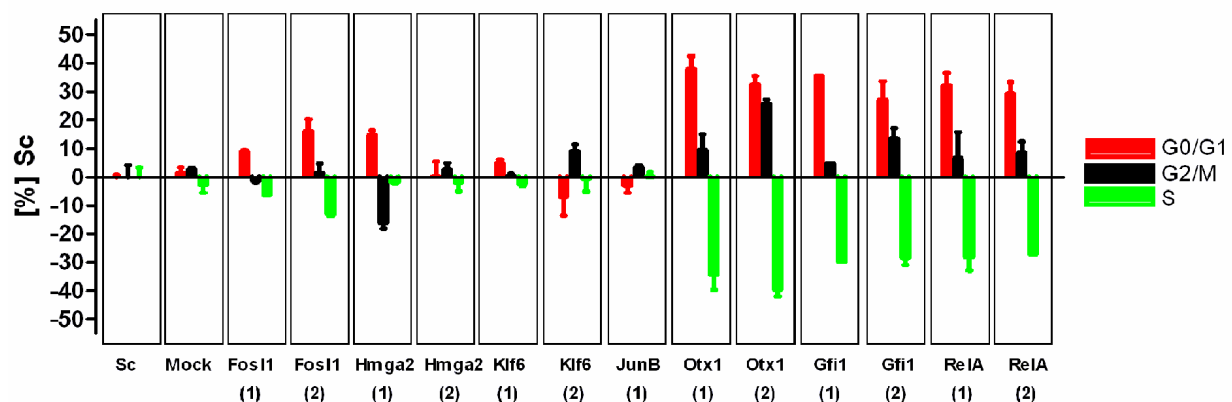


Abb. 18 Zusammenfassung der Zellzyklusanalysen.

Vergleich der Ergebnisse: Mittelwerte mit SD aus zwei biologisch unabhängigen Messungen prozentual auf die Werte der einzelnen Zellzyklusphasen von Rose A2/5 Zellen bezogen. G0/G1-; die S- und die G2/M-Phase der Sc-Kontrolle entspricht 100 %. Rot: G0/G1-Phase. Grün: S-Phase. Schwarz: G2/M-Phase. Interne Kontrollen: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc), Zellen mit Transfektionsreagenz (Mock). (1); (2): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Wie man in dieser Darstellung erkennen kann, ergaben die Knock-downs von Otx1, Gfi1 und RelA eine Reduktion der S-Phase um 27-39,5 %. Die Anzahl der Zellen in der G0/G1-Phase stieg dementsprechend proportional an. Außer bei Otx1 (Duplex 2) erfolgte keine Verschiebung der Zellen in die G2/M-Phase, was im Falle von Otx1 (Duplex 2) vermutlich auf vorhandene Off-target-Effekte zurückzuführen war (Abb. 18). Im Gegensatz dazu resultierten die Knock-downs von Fos11, Hmga2, Klf6 und JunB in keinem so deutlichen Unterschied. Jedoch ergab sich eine Verschiebung der Zellen aus der S-Phase in die G0/G1- bzw. G2/M-Phase von bis zu 18 % (Hmga2 mit

Duplex 1 und Fosl1 mit Duplex 2). Da sich diese Einflüsse auf den Zellzyklus hierbei nur auf einen von zwei unabhängigen siRNA-Duplexen bezogen, handelte es sich hier vermutlich um unspezifische Off-target-Effekte (Abb. 18). Eine spezifische, zusätzliche Verschiebung der Zellen in die G2/M-Phase, wie nach Zugabe des U0126-Inhibitors, wurde folglich nach keinem Knock-down gemessen (Abb. 16, Abb. 18).

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen zeigen, dass es sich bei den Transkriptionsfaktoren Otx1, Gfi1, RelA um Zellzyklusregulatoren handelt. Zusammen mit den Ergebnissen der Proliferationsanalysen ergibt sich hieraus, dass die spezifische Hemmung der ankerabhängigen (2D) Proliferation der Rose A2/5 Zellen durch Otx1, Gfi1 und RelA auf den G0/G1-Zellzyklusarrest zurückzuführen ist (Abb. 15, Abb. 18). Die Transkriptionsfaktoren Fosl1, Hmga2, Klf6 und JunB, die keinen spezifischen Einfluss auf die generelle Proliferation sondern nur auf die Ankerunabhängigkeit der Rose A2/5 Zellen hatten, zeigten keine spezifischen Effekte auf die Zellzyklusregulation (Abb. 15, Abb. 18). Somit sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen mit den Ergebnissen der Proliferationsanalysen konsistent.

2.4 Rolle der differenziell exprimierten Transkriptionsfaktoren bei der KRAS-vermittelten Deregulation des Transkriptoms

Den phänotypischen Veränderungen von Zellen liegt eine massive Deregulation des genetischen Programms zugrunde (Sers, et al., 2002; Tchernitsa, et al., 2004; Zuber, et al., 2000).

Die Transkriptionsfaktoren Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA zeigten jeweils einen partiellen Einfluss auf die Morphologie der Rose A2/5 Zellen und zugleich eine unterschiedliche Rolle bei deren Proliferation (Abb. 9, Abb. 15). Daraus ergab sich die zentrale Frage nach Transkriptionsfaktor-Zielgenen und nach dem Ausmaß ihrer Beteiligung an der KRAS-bedingten genetischen Deregulation der Rose A2/5 Zellen.

Die Untersuchung dieser Frage erfolgte mittels Microarray-Analysen. Durch Erstellung von Expressionsprofilen können Änderungen im Transkriptom erfasst und die differenziell exprimierten Zielgene einzelnen Ereignissen zugeordnet werden.

Die Erstellung der Expressionsprofile erfolgte unter Verwendung von selbst hergestellten Microarrays, "Ras signaling target array"-2 (RASTA-2), mit 329 darauf

gespotteten Oligonukleotiden für korrespondierende Gene mit bekannter Funktion in der Tumorentwicklung. Die hier verwendeten Arrays stellten eine Erweiterung des bereits publizierten RASTA-Microarray dar (Tchernitsa, et al., 2004).

Die Erfassung der Unterschiede im Expressionsstatus der Gene zwischen zwei Zellproben erfolgte mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten cDNA (grün und rot), die auf die zuvor gespotteten Arrays hybridisiert wurden. Die Anfertigung von jeweils zwei Chips mit umgekehrt markierten Proben (Farbstoff-Inversion) diente zur Erhöhung der Spezifität und somit zur Fehlerminimierung. Die korrespondierenden Oligonukleotide wurden auf die Microarrays in dreifacher Ausführung gespottet, was im Endeffekt sechs Signalintensitäten für ein Gen ergab. Die Angabe des Mittelwertes aus den sechs Analyse-Werten erfolgte nach einer globalen Normalisierung gegen die Intensitäten von Hauskeeping-Genen. Der Ausschluss für herunter- bzw. hochregulierte Gene lag bei $\pm 0,7$ (\log_2).

2.4.1 Identifizierung der Zielgene von KRAS und den KRAS-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren

Zunächst erfolgte die Erstellung des Expressionsprofil von Rose 199 im Vergleich zu Rose A2/5 Zellen. Dadurch wurden Gene erfasst, die nach der kontinuierlichen Aktivierung von KRAS und somit nach der Transformation der Rose 199 Zellen eine differenzielle Expression zeigten. Die Analyse des Expressionsprofils ergab bei 149 Genen eine Änderung in deren Expression. Davon waren 74 Gene in Rose A2/5 Zellen herunterreguliert und 75 Gene überexprimiert im Vergleich zu Rose 199 Zellen. Bei 180 Genen waren keine Unterschiede festzustellen (Abb. 19, siehe Anhang). Dieses Ergebnis zeigte mit $> 80\%$ eine sehr gute Reproduzierbarkeit zu den bereits publizierten Daten (Tchernitsa, et al., 2004).

Durch Analysen der Expressionsprofile nach individuellen Knock-downs von Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA wurde der Einfluss dieser Faktoren auf die Regulation der differenziell exprimierten Gene im Rose Zellsystem ermittelt (Abb. 19). Die Sc-Kontrolle zeigte mit $3,6\%$ nur geringe Off-target-Effekte (Expressionsprofil von Sc versus Mock). Diese lagen deutlich unter den Off-target-Effekten, die für andere kommerzielle Negativ-Kontrollen beschrieben sind (Tschuch, et al., 2008).

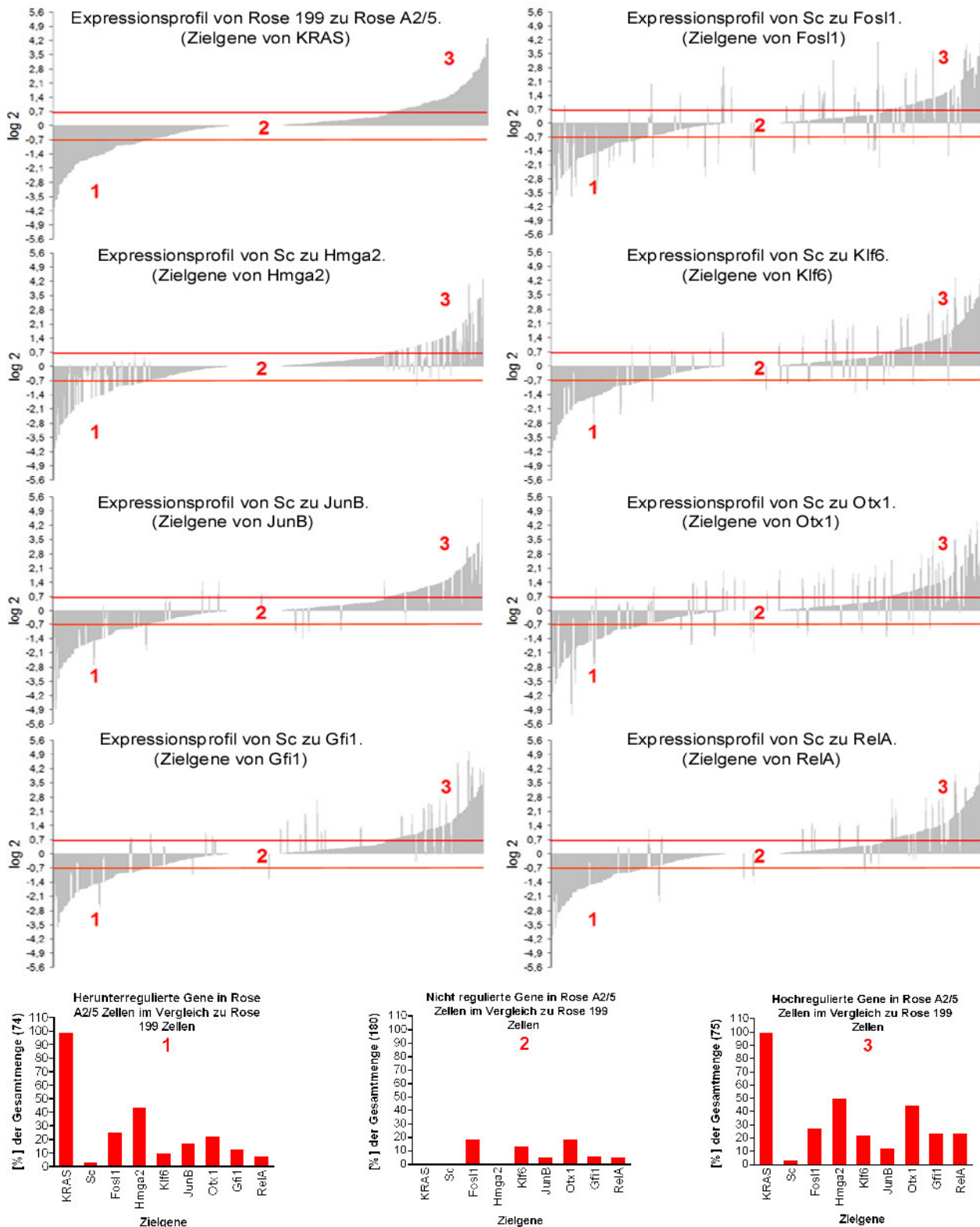


Abb. 19 Ergebnisse der Microarray-Analysen.

Transfektionen der Zellen siehe Abb. 6. Die Isolierung der Gesamt-RNA fand 48 h nach den Transfektionen statt. Die Erstellung der Expressionsprofile erfolgte mit Gesamt-RNA unter Verwendung des selbst hergestellten Microarrays, "Ras signaling target array"-2 (RASTA-2). Expressionsprofile: Normalisierte Werte angeordnet nach der Expressionsstärke der Gene in Rose A2/5 im Vergleich zu Rose 199 Zellen. Rote Linien: Ausschluss für herunter- bzw. hochregulierte Gene bei $\pm 0,7$ (\log_2). 1; 2; 3: Bereiche in Expressionsprofilen, mit herunterregulierten, nicht regulierten bzw. hochregulierten Genen in Rose A2/5 Zellen im Vergleich zu Rose 199 Zellen (Zielgene von KRAS). Y-Achse: Expressionsstärke der Zielgene (\log_2). Interne Kontrolle: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc).

Die Analyse der Expressionsprofile ergab, dass die untersuchten Transkriptionsfaktoren jeweils einen distinkten Satz von Zielgenen regulierten. Der Transkriptionsfaktor Hmga2 regulierte die meisten der KRAS-abhängigen Gene (Rose 199 versus Rose A2/5). Zu seinen Zielgenen gehörten 45 % der herunterregulierten und 51 % der hochregulierten Gene, die im Rose Zellsystem differenziell exprimiert waren. Der Einfluss der übrigen untersuchten Transkriptionsfaktoren auf die KRAS-abhängig exprimierten Gene war, mit 8-26 % bei den herunterregulierten Genen und 13-45 % bei den hochregulierten Genen, deutlich geringer ausgeprägt als bei Hmga2 (Abb. 19). Die untersuchten Transkriptionsfaktoren beeinflussten auch eine unterschiedliche Anzahl der 180 Gene, die zwischen Rose 199 und Rose A2/5 Zellen nicht reguliert waren. Otx1 und Fosl1 hatten mit jeweils 19 % den stärksten und Hmga2 mit 0,6 % den geringsten Einfluss auf die 180 Gene (Abb. 19).

2.4.2 Einfluss der Transkriptionsfaktoren auf die KRAS-bedingte genetische Deregulation

Bei einer vollständigen Reversion des transformierten Phänotyps der Rose A2/5 Zellen zu Rose 199 Zellen würde man auch eine vollständige Reversion des Expressionsniveaus der KRAS-abhängigen Genen erwarten.

Wie man den Expressionsprofilen aus Abbildung 19 entnehmen kann, beeinflussten Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA partiell die KRAS-abhängige Genexpression. Dabei wurde in einigen Fällen die Expression auf das Niveau von Rose 199 Zellen revertiert. Jedoch wurden auch Gene, die KRAS-abhängig herunterreguliert waren noch stärker herunterreguliert und KRAS-abhängig überexprimierte Gene noch stärker überexprimiert (Abb. 19). Von Interesse war daher, wie viele Zielgene eines Transkriptionsfaktors nach dem Knock-down in Rose A2/5 Zellen auf den Expressionsspiegel der nicht-transformierten Rose 199 Zellen revertiert waren (Tab. 2).

Der Knock-down des Transkriptionsfaktors Hmga2 bewirkte die Reversion der meisten KRAS-abhängig regulierten Gene auf das Niveau der Rose 199 Zellen, der von RelA die wenigsten. Der Knock-down von Otx1 bewirkte bei den meisten KRAS-abhängig überexprimierten Genen eine noch stärkere Überexpression bzw. bei KRAS-abhängig herunterregulierten Genen eine noch stärkere Herunterregulation und der Knock-down von Hmga2 die der wenigsten (Tab. 2).

Tab. 2 Einfluss der untersuchten Transkriptionsfaktoren auf die Expression der KRAS-abhängig regulierten Gene.

Anzahl der jeweiligen Zielgene eines Transkriptionsfaktors. In Klammern: Prozentuale Anteile an der Regulation der 149 Gene, die zwischen Rose 199 und Rose A2/5 differenziell exprimiert waren (KRAS-abhängig). Als reguliert wurden alle Gene angesehen, die über der Ausschlussgrenze bei $\pm 0,7$ (log2) lagen.

Knock-down:	Fos1	Hmga2	Klf6	JunB	Otx1	Gfi1	RelA
Regulierte Gene insgesamt	40	71	25	23	51	28	24
(Anteil an den 149 KRAS-abhängigen Genen)	(27 %)	(47,7 %)	(16,8 %)	(15,4 %)	(34,2 %)	(18,8 %)	(16,1%)
Reversion der KRAS-abhängigen Deregulation um:							
80-100 %	5 (3,4 %)	24 (16,1 %)	5 (3,4 %)	4 (2,7 %)	6 (4 %)	4 (2,7 %)	3 (2 %)
50-80 %	17 (11,4 %)	35 (23,5 %)	6 (4 %)	4 (2,7 %)	16 (11 %)	6 (4 %)	9 (6 %)
30-50 %	6 (4 %)	6 (4 %)	1 (0,7 %)	9 (6 %)	7 (4,7 %)	2 (1,3 %)	2 (1,3 %)
0-30 %	2 (1,3 %)	3 (2 %)	0 (0 %)	1 (0,7 %)	3 (2 %)	2 (1,3 %)	0 (0 %)
Quantitative Zunahme der KRAS-abhängigen Deregulation um:							
	10 (6,7 %)	3 (4 %)	13 (8,7 %)	5 (3,4 %)	19 (12,8 %)	14 (9,4 %)	10 (6,7 %)

Zusammenfassend ergibt sich aus den Ergebnissen, dass alle untersuchten Transkriptionsfaktoren eine unterschiedlich stark ausgeprägte partielle Reversion der KRAS-abhängig exprimierten Zielgene bewirkten. Zugleich verursachten sie eine noch stärkere Überexpression der KRAS-abhängig überexprimierten Gene bzw. eine noch stärkere Herunterregulation der KRAS-abhängig herunterregulierten Gene (Abb. 19, Tab. 2).

2.4.3 Partielle Überlappung der Expressionsprofile

Die Untersuchungen der Überlappung zwischen den einzelnen Expressionsprofilen erfolgten durch hierarchische Clusteranalysen (Abb. 20).

Erwartungsgemäß zeigten die Expressionsprofile der unabhängigen siRNA-Duplexe eines Transkriptionsfaktors sehr große Übereinstimmung, die zwischen 70-92 % lag. In dem hierarchischen Cluster sind diese daher direkt nebeneinander angeordnet (Abb. 20).

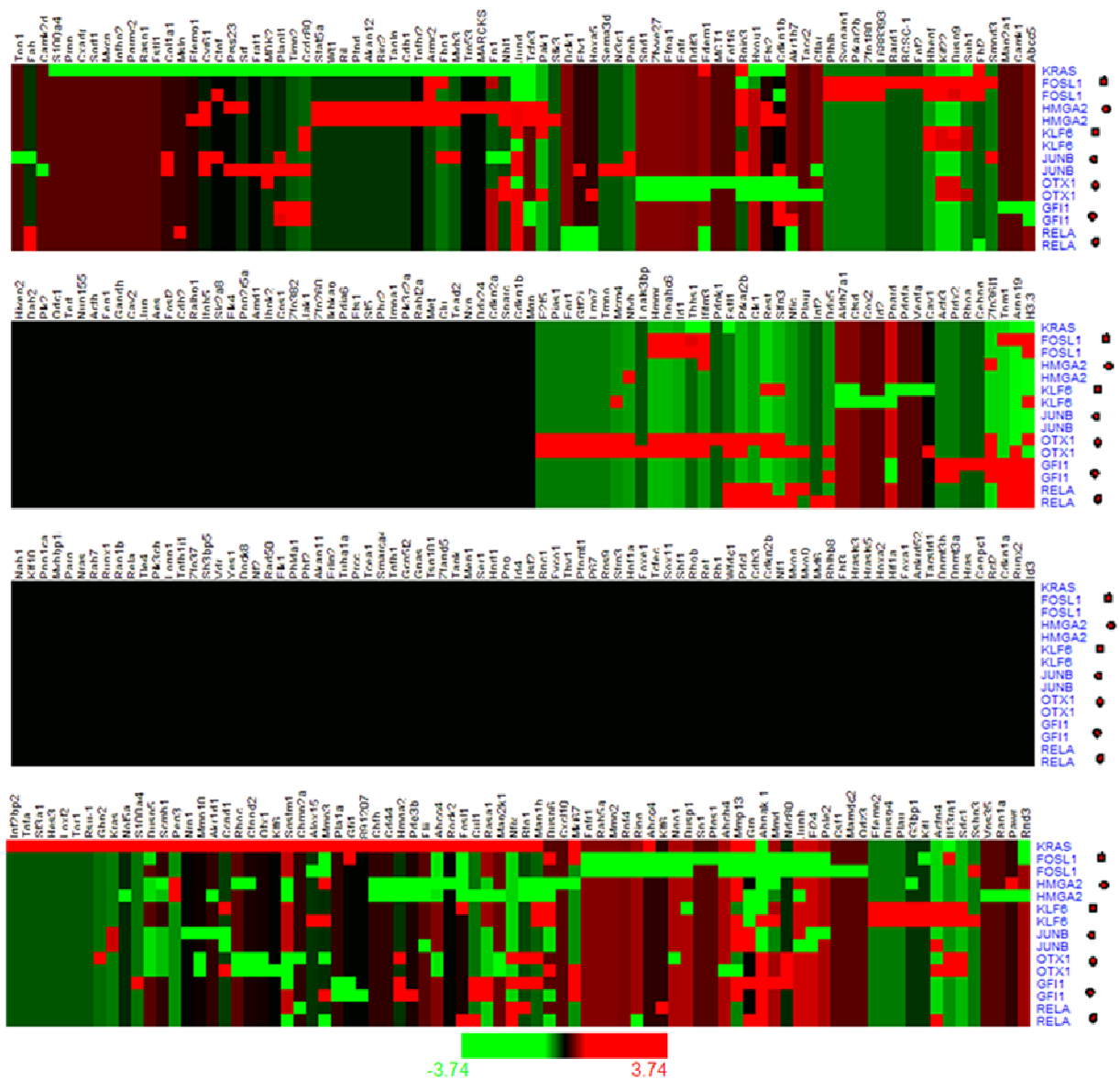


Abb. 20 Partielle Überlappung der Zielgene von KRAS, Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA.

Die hierarchische Clusteranalyse erfolgte unter Verwendung vollständiger Datensätze der Microarray-Ergebnisse (siehe Anhang). Für jeden Transkriptionsfaktor sind jeweils zwei Expressionsprofile dargestellt, die mit unabhängigen siRNA-Duplexen generiert wurden (roter Punkt). KRAS: In Rose A2/5 Zellen differenziell exprimierte Gene im Vergleich zu Rose 199 Zellen (KRAS-abhängig reguliert). Schwarz: nicht regulierte Gene.

Die hierarchische Clusteranalyse ergab, dass Fosl1 und Hmga2 die meisten Gene, die nach KRAS-bedingter Transformation der Zellen differenziell exprimiert waren, regulierten. Interessanterweise ergab diese Analyse auch, dass die Zielgene von Otx1, Gfi1 und RelA die wenigsten Überlappungen mit KRAS-abhängig regulierten Genen zeigten (Abb. 20). Die Faktoren Otx1, Gfi1 und RelA unterschieden sich von den übrigen untersuchten Faktoren durch ihren spezifischen Einfluss auf die uneingeschränkte, ankerabhängige (2D) Proliferation, die auf den G0/G1-

Zellzyklusarrest der Rose A2/5 Zellen zurückzuführen war (Abb. 15, Abb. 18, Abb. 20). Das Ergebnis der Clusteranalysen ist demnach stimmig mit den vorherigen Ergebnissen der Proliferationsstudien und der Zellzyklusanalysen.

Obwohl die Zielgene der einzelnen Transkriptionsfaktoren miteinander partiell überlappten, existierte kein gemeinsames Zielgen, das von allen auf die gleiche Weise reguliert wurde (Abb. 20). Einschränkend sollte hier jedoch bemerkt werden, dass die Microarray-Analysen nur einen ausgewählten Teil des Transkriptoms abdeckten, wodurch nicht alle potentiell regulierten Gene erfasst wurden.

2.4.4 Zuordnung der ermittelten Zielgene und ihrer Produkte zu bereits bekannten biologischen Funktionen

Zu den Zielgenen von FosI1, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA gehörten auch Gene, die im Rose Zellsystem nicht differenziell exprimiert waren. Zudem zeigten die Transkriptionsfaktoren einen unterschiedlich stark ausgeprägten Einfluss auf den Zellzyklus und die Proliferation der Rose A2/5 Zellen (Abb. 15, Abb. 18). Daher war es von Interesse die funktionelle Rolle ihrer Zielgene und Produkte näher zu untersuchen (Abb. 21).

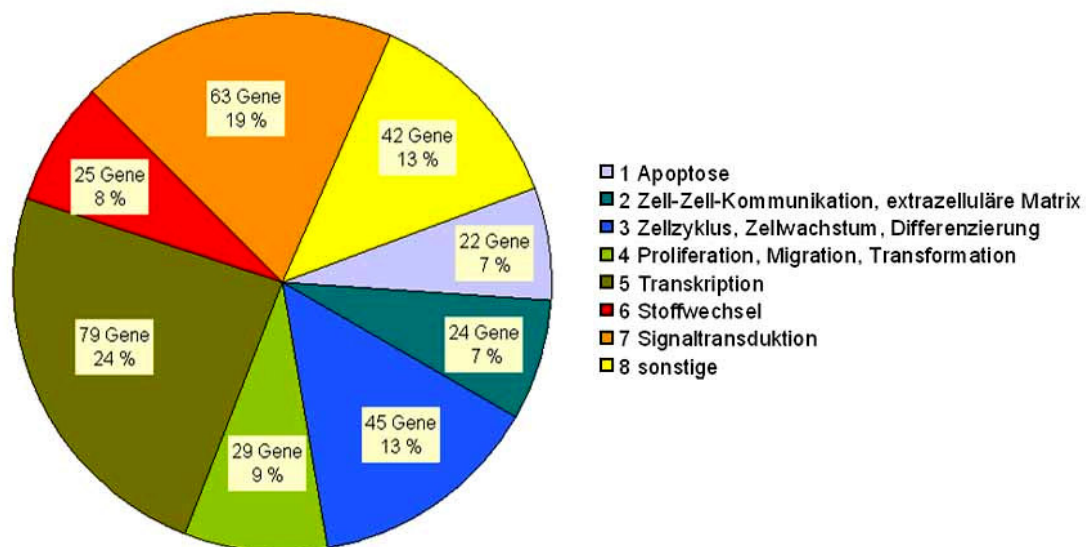


Abb. 21 Biologische Funktionen der Produkte aller 329 Gene, die auf dem RASTA-2 Microarray vertreten waren.

Die Einteilung der 329 Gene des Microarray erfolgte nach „Gene Ontology“ entsprechend der biologischen Funktion ihrer Produkte. Im Falle vom Vorhandensein mehrerer Funktionen, erfolgte die Zuordnung zu einer Kategorie entsprechend der ersten vorgeschlagenen Funktion.

Nach der Gene Ontology (<http://rgd.mcw.edu/>) fallen die Produkte der 329 auf dem Chip vertretenen Gene in folgende Kategorien: 1) Apoptose; 2) Zell-Zell-Kommunikation, extrazelluläre Matrix; 3) Zellzyklus, Zellwachstum, Differenzierung; 4) Proliferation, Migration, Transformation; 5) Transkription; 6) Stoffwechsel; 7) Signaltransduktion; 8) Sonstige. Bei den 180 Genen, die nicht im Rose Zellsystem differenziell exprimiert wurden, handelte es sich ebenfalls um Gene, die in der Literatur als relevant für Tumorentwicklung beschrieben wurden (Abb. 21, siehe Anhang).

Die Analyse der biologischen Funktion der Zielgene ergab, dass die Transkriptionsfaktoren Fos11, Hmga2, JunB, Otx1, Gfi1, RelA sowie KRAS (differenziell exprimierte Gene zwischen Rose 199 und Rose A2/5) überwiegend die Transkription und die Signaltransduktion regulierten. Die meisten Zielgene von JunB hatten Funktionen im Zellzyklus, Zellwachstum und Differenzierung (Tab. 3).

Tab. 3 Biologische Funktion der Zielgene von KRAS und der KRAS-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA.

	KRAS	Fos11	Hmga2	Klf6	JunB	Otx1	Gfi1	RelA
Regulierte Gene insgesamt (= 100 %)	149	75	72	50	34	85	40	35
Apoptose (in %)	7	8,0	5,6	8,0	5,9	4,7	7,5	5,7
Zell-Zell-Kommunikation, extrazelluläre Matrix (in %)	16	5,3	4,2	6,0	8,8	3,5	10,0	5,7
Zellzyklus, Zellwachstum, Differenzierung (in %)	17	8,0	11,1	12,0	20,6	12,9	17,5	14,3
Proliferation, Migration, Transformation (in %)	17	14,7	12,5	16,0	14,7	10,6	10,0	11,4
Transkription (in %)	28	21,3	20,8	24,0	8,8	29,4	25,0	22,9
Stoffwechsel (in %)	14	8,0	9,7	12,0	11,8	9,4	2,5	11,4
Signaltransduktion (in %)	30	18,7	19,4	22,0	14,7	20,0	20,0	17,1
Sonstige (in %)	16	10,7	9,7	4,0	5,9	9,4	10,0	14,3

2.5 Transkriptionelle Netzwerke im Rose Zellsystem

Die funktionellen Untersuchungen und die Analysen der Expressionsprofile von Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA zeigten jeweils deren partiellen Einfluss auf die neoplastische Transformation der Rose A2/5 Zellen und auf das assoziierte genetische Programm (Abb. 9, Abb. 15, Abb. 19).

Es stellte sich daher die Frage, inwiefern die Transkriptionsfaktoren sich gegenseitig beeinflussen und ob die partiellen Effekte darauf zurückzuführen sind.

Wie die Microarray-Analysen nach RNA-Interferenzexperimenten zeigen, übte ein Transkriptionsfaktor teilweise einen starken Einfluss auf die Expression der übrigen Transkriptionsfaktoren aus (Tab. 4). Zum Beispiel erfolgte nach dem Knock-down von Fosl1 in Rose A2/5 Zellen eine Herunterregulation der Klf6, JunB und RelA Expression. Das deutet auf eine aktivierende Rolle von Fosl1 auf deren Expression hin. Gleichzeitig führte die Eliminierung von Fosl1 aus Rose A2/5 Zellen zu einer Überexpression der Faktoren Hmga2, Otx1, Gfi1 über das schon erhöhte Niveau nach KRAS-Transformation hinaus. Dies deutet auf einen hemmenden Einfluss von Fosl1 auf die Expression von Hmga2, Otx1 und Gfi1 hin (Tab. 4).

Tab. 4 Vergleich der Expression von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA.

Expression der Transkriptionsfaktoren ermittelt durch RASTA-2 Microarray-Analysen (log2). Als Vergleich diente die Expression zwischen Rose 199 und Rose A2/5 Zellen (KRAS-abhängige Überexpression). Ein negativer Wert entspricht der Herunterregulation und ein positiver Wert einer noch stärkeren Hochregulation der Expression in Rose A2/5 Zellen. n.d.: Nicht detektierbare Unterschiede zu Rose A2/5 Zellen (Werte zwischen 0,7 und -0,7). Rot: Werte nach dem Knock-down der Transkriptionsfaktoren in Rose A2/5 Zellen. (1); (2): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Regulation von:	Fosl1	Hmga2	Klf6	JunB	Otx1	Gfi1	RelA
KRAS-abhängige Überexpression:	1,963	2,6789	1,1763	0,893	2,2963	1,3636	(0,395)
Knock-down von:							
Fosl1 (1)	-1,947	0,836	-0,974	-1,346	0,9655	1,089	-0,865
Fosl1 (2)	-1,36	(0,538)	(-0,687)	-1,068	(0,5017)	0,8265	(-0,48)
Hmga2 (1)	-1,205	-2,342	-0,868	-0,907	n.d.	n.d.	n.d.
Hmga2 (2)	-1,107	-1,748	-0,702	-1,105	n.d.	n.d.	n.d.
Klf6 (1)	1,01	0,783	-0,94	-0,772	n.d.	n.d.	n.d.
Klf6 (2)	0,8647	0,763	-0,8541	-0,805	n.d.	n.d.	n.d.
JunB (1)	n.d.	n.d.	n.d.	-0,985	n.d.	-0,731	n.d.
JunB (2)	-0,9652	-0,8217	-0,9182	-1,6682	n.d.	n.d.	n.d.
Otx1 (1)	0,7863	1,049	-0,7082	n.d.	-2,0879	n.d.	n.d.
Otx1 (2)	0,707	0,771	-1,346	n.d.	-1,4339	n.d.	n.d.
Gfi1 (1)	n.d.	1,5741	-0,9826	n.d.	n.d.	-1,3405	n.d.
Gfi1 (2)	n.d.	1,0287	(-0,494)	n.d.	n.d.	-1,0455	n.d.
RelA (1)	0,9055	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,804
RelA (2)	1,3767	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,905

Um das Ausmaß der gegenseitigen Regulation besser erfassen zu können, wurden die Ereignisse aus Tabelle 4 ausgewertet und in Form eines Pfeildiagramms dargestellt (Abb. 22).

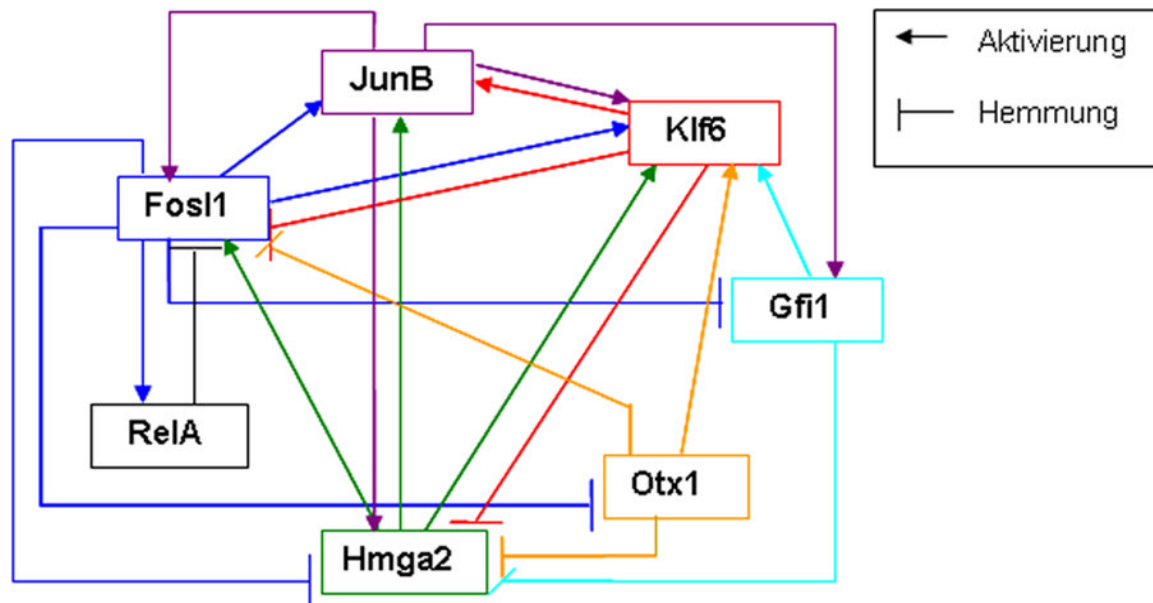


Abb. 22 Hypothetische Netzwerkregulation der untersuchten Transkriptionsfaktoren.
Das Pfeildiagramm basiert auf den Microarray-Daten aus Tabelle 4.

Ein Transkriptionsfaktor konnte demnach sowohl aktivierende als auch hemmende Wirkung auf die Expression der übrigen untersuchten Faktoren haben. Fosl1 zeigte den größten und RelA den geringsten regulatorischen Einfluss auf die anderen untersuchten Transkriptionsfaktoren. Der Einfluss von Hmga2, JunB, Klf6, Otx1 und Gfi1 war vergleichbar stark ausgeprägt (Abb. 22).

Bei der Regulation der Genexpression könnte es sich um eine direkte Beeinflussung handeln, zum Beispiel durch die Bindung des Transkriptionsfaktors an den Promotor des Zielgens und nachfolgende direkte Aktivierung der Transkription. Ein indirekter Einfluss über die Neusynthese eines zwischengeschalteten Transkriptionsfaktors wäre ebenfalls möglich, da eine Microarray-Analyse nur Gesamtänderungen im Expressionsniveau erfasst, nicht aber den Regulationsmechanismus aufklären kann. Aus dem hypothetischen Modell in Abbildung 22 lässt sich intuitiv keine Aussage darüber treffen, welche Interaktionen direkter und welche indirekter Natur sind. Um direkte und indirekte regulatorische Einflüsse voneinander zu unterscheiden, wurde von Dr. Stefan Legewie (Dissertation/HU-Berlin) ein Modell der (direkten) regulatorischen Interaktionen zwischen Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA errechnet (Abb. 23). Dieses Modell basiert auf den Microarray-Daten aus

Abbildung 22. Die gemessenen Perturbationsdaten wurden bioinformatisch unter der Verwendung des so genannten „Reverse Engineering“-Algorithmus, zu dem „Modular response analysis“ (MRA) gehört, analysiert (Kholodenko, et al., 2002). Der Begriff „Reverse Engineering“ bedeutet hierbei, dass aus experimentellen Daten die Funktionalität (in diesem Fall die Topologie) des Netzwerk abgeleitet wird. Dabei gilt die Annahme, dass die regulatorischen Interaktionen zwischen den Netzwerkspezies linearer Natur sind. Linear bedeutet hierbei, dass Proportionalität zwischen Transkriptionsfaktor und Transkription des Zielgens angenommen wird. Nimmt also die Transkriptionsfaktor-Konzentration um den Faktor x zu, steigt auch die Transkriptionsrate des Zielgens um den gleichen Faktor. Es ist jedoch zu beachten, dass die mittels der MRA berechneten Netzwerktopologien keine Hinweise über die Art der regulatorischen Interaktionen im biochemischen Sinne liefern. So können zum Beispiel die Bindung eines Faktors an den Promotor des anderen und Protein-Protein-Wechselwirkungen nicht voneinander unterschieden werden. Vielmehr bedeutet eine direkte Interaktion im Sinne der MRA lediglich, dass der regulierende Faktor den regulierten Faktor ohne Mitwirkung eines anderen, in den Rechnungen berücksichtigten, Faktors beeinflusst.

Abbildung 23 zeigt Netzwerkinteraktionen, für die die MRA-Berechnungen sowohl eine starke Regulation als auch eine hohe statistische Signifikanz vorhersagen. Zum Beispiel sagt das Modell voraus, dass der Faktor Hmga2 einen starken aktivierenden Einfluss auf Fos11 hat und dass dies unabhängig von den Transkriptionsfaktoren Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA geschieht. Aus dem Modell geht weiterhin hervor, dass es eine lineare aktivierende Kaskade zwischen Hmga2, Fos11, Klf6 und JunB gibt. Interessanterweise werden laut Modell die Faktoren RelA und Otx1 durch keinen der anderen, in die Rechnungen miteinbezogenen, Transkriptionsfaktoren reguliert (Abb. 23). Genauso wie Gfi1, das nur schwach durch RelA gehemmt wird, scheinen RelA und Otx1 hauptsächlich von externen Einflüssen, wie z.B. vom onkogenen KRAS, reguliert zu werden (außerhalb des Netzwerkes regulierte Faktoren). Im Gegensatz dazu werden Fos11, Hmga2, Klf6 und JunB durch die Faktoren Gfi1, RelA und Otx1 und durch sich selbst reguliert (innerhalb des Netzwerkes regulierte Faktoren).

Diese Klassifizierung der Transkriptionsfaktoren nach der Regulation außerhalb und innerhalb des Netzwerkes ist interessanterweise im Einklang mit der vorherigen

Klassifizierung anhand von Proliferationsstudien und Zellzyklusanalysen. Die außerhalb des Netzwerkes regulierten Faktoren Otx1, Gfi1 und RelA beeinflussten durch Regulation des Zellzyklus die ankerabhängige (2D) Proliferation (Abb. 15, Abb. 18, Abb. 23). Im Gegensatz dazu hemmten die innerhalb des Netzwerkes regulierten Faktoren Fos11, Hmga2, Klf6 und JunB spezifisch die ankerunabhängige (3D) Proliferation (Abb. 15, Abb. 18, Abb. 23).

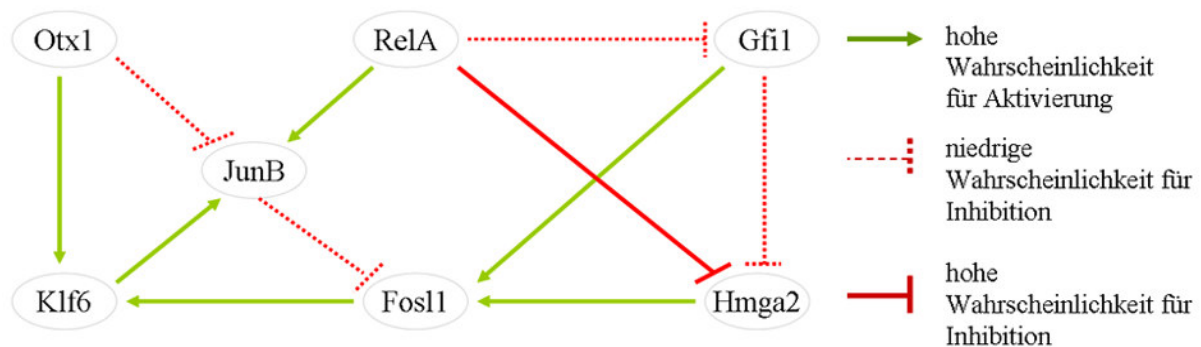


Abb. 23 Modell für Wahrscheinlichkeiten einer direkten Interaktion zwischen Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA.

Das Modell wurde basierend auf den Microarray-Daten aus Tabelle 4 unter der Anwendung der „Modular response analysis“ (MRA) berechnet. Die ermittelten Wahrscheinlichkeiten für eine lineare Interaktion zwischen Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA wurden in Form eines Pfeildiagramms dargestellt. Die Möglichkeit von Rückkopplungen wurde in diesem Modell nicht berücksichtigt. Analysen durchgeführt von Dr. Stefan Legewie (Dissertation/HU-Berlin).

Interessanterweise erklärt die Netzwerkstruktur nicht den ähnlichen, partiellen Einfluss der Transkriptionsfaktoren auf die EMT der Rose A2/5 Zellen (Abb. 9). In diesem Fall kommt der partielle Effekt durch den fehlenden Einfluss aller untersuchten Transkriptionsfaktoren auf die Reaktivierung epithelialer Marker, wie dem von E-cadherin, zustande (siehe 2.3.1).

2.6 Validierung und Erweiterung des Modells der transkriptionellen Netzwerke

2.6.1 Validierung der Microarray-Daten mittels RT-PCR

Die Validierung der Microarray-Daten erfolgte mittels RT-PCR-Analysen mit der bereits für die Microarrays verwendeten RNA (Abb. 24).

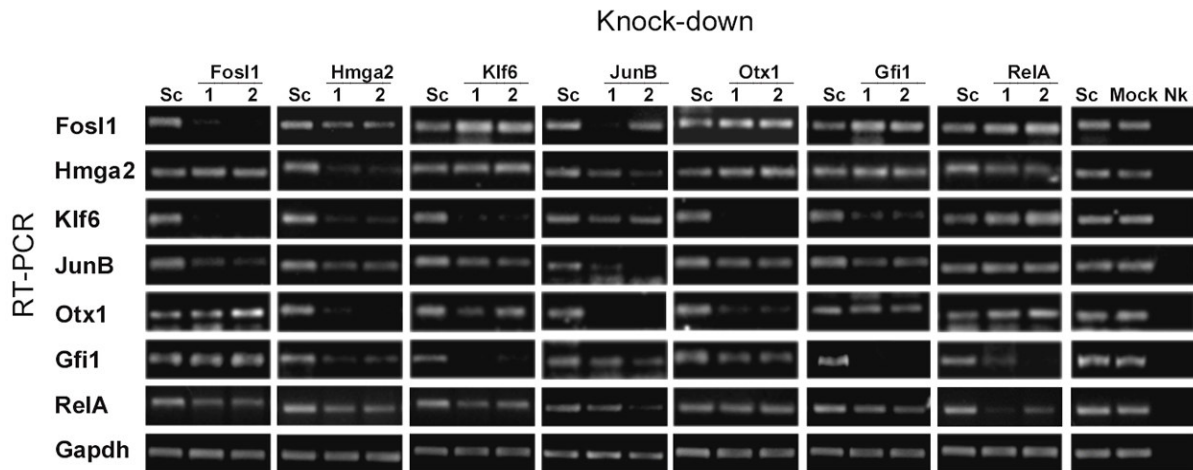


Abb. 24 Validierung der Microarray Daten mittels RT-PCR.

Transfektionen der Zellen siehe Abb. 6. RT-PCR-Analysen: Nachweis der mRNA-Expression von Fos1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA (siehe Abb. 6). Verwendet wurde RNA von den Microarray-Analysen (Abb. 19). Vertikale Reihen: Regulatorischer Einfluss eines Faktors auf die übrigen Transkriptionsfaktoren. Interne Kontrollen: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc), Zellen mit Transfektionsreagenz (Mock). Nk: Negativ Kontrolle H₂O. (1); (2): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Ein direkter Vergleich der Datensätze aus Microarray- und RT-PCR-Analysen erfolgte nach Normalisierung der Expressionswerte. Die Expressionswerte nach dem Knock-down wurden hierzu prozentual auf die Expressionswerte des jeweiligen Transkriptionsfaktors in Rose A2/5 Zellen bezogen (Tab. 5).

Insgesamt wurden bei den RT-PCR-Untersuchungen mehr Regulationsereignisse detektiert als durch die Microarray-Analysen. Die mit beiden Methoden nachgewiesene Expression der Transkriptionsfaktoren stimmte mit 92 % überein. Bei den 8 % der übrigen Fälle, handelte es sich nicht um eine gegenläufige Richtung der Regulation, sondern um größere Unterschiede in den errechneten Werten aus beiden Detektions-Methoden (Tab. 5).

Die qualitative Analyse der RT-PCR-Ergebnisse bestätigte somit die Ergebnisse der Microarray-Daten (Abb. 24, Tab. 5).

2.6.2 Validierung der RNA-Analysen mittels Western Blot

Aufgrund der post-transkriptionellen und post-translationalen Regulation erlaubten die Microarray-Ergebnisse keine Rückschlüsse auf die Proteinexpression der Zielgene. Daher wurde die mRNA-Expression mit der Proteinexpression verglichen (Abb. 25).

Tab. 5 Vergleich der Microarray- und RT-PCR-Ergebnisse.

Die mittels Microarray-Analysen generierten Expressionswerte der Transkriptionsfaktoren wurden prozentual auf die Expressionswerte des jeweiligen Transkriptionsfaktors in Rose A2/5 Zellen berechnet (aus Tab. 4). Die densitometrische Analyse der PCR-Produkte aus Abbildung 24 erfolgte im Verhältnis auf die endogene Kontrolle (Gapdh) und die prozentuale Berechnung auf die Werte der Sc-Kontrolle. < 0: Bei Reduktion der Expression über die Menge aus Rose A2/5-Zellen hinaus. Nur in Fällen möglich, wo eine messbare endogene Expression des Transkriptionsfaktors bereits in Rose 199 Zellen vorlag. Interne Kontrolle für RT-PCR: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc). n.d.: Nicht detektierbare Unterschiede zu Rose A2/5 Zellen (Werte zwischen 0,7 und -0,7). (1); (2) Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Regulation von:		Fosl1	Hmga2	Klf6	JunB	Otx1	Gfi1	RelA
Sc (Rose 199/A2/5)	RT-PCR	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	Microarray	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)
Knock-down von (in %):								
Fosl1 (1)	RT-PCR	20,9	92,7	20,8	37,6	136,2	100,4	59,4
	Microarray	(0,82)	(131,2)	(17,2)	(< 0)	(142,0)	(179,9)	(< 0)
Fosl1 (2)	RT-PCR	21,1	120,2	22,4	57,3	215,9	135	72,7
	Microarray	(30,7)	(120,1)	(41,6)	(< 0)	(121,8)	(160,6)	(< 0)
Hmga2 (1)	RT-PCR	59,3	27,8	27,8	50,2	30,5	56,8	64,3
	Microarray	(38,6)	(12,6)	(26,2)	(< 0)	(n.d.)	(n.d.)	(n.d.)
Hmga2 (2)	RT-PCR	50,7	18,7	23,6	46,9	21,2	61,4	46,6
	Microarray	(43,6)	(34,7)	(40,3)	(< 0)	(n.d.)	(n.d.)	(n.d.)
Klf6 (1)	RT-PCR	153,1	123,9	26,3	59,9	29,5	21,1	52,7
	Microarray	(151,5)	(129,2)	(20,1)	(13,5)	(n.d.)	(n.d.)	(n.d.)
Klf6 (2)	RT-PCR	154,0	136,4	25,1	55,8	51,0	11,8	62,8
	Microarray	(144,0)	(128,5)	(27,4)	(9,8)	(n.d.)	(n.d.)	(n.d.)
JunB (1)	RT-PCR	20,0	54,4	75,8	31,9	13,5	49,8	72,9
	Microarray	(n.d.)	(n.d.)	(n.d.)	(< 0)	(n.d.)	(46,4)	(n.d.)
JunB (2)	RT-PCR	51,0	22,6	79,3	14,3	2,4	37,9	44,7
	Microarray	(50,8)	(69,3)	(21,9)	(< 0)	(n.d.)	(n.d.)	(n.d.)
Otx1 (1)	RT-PCR	127,6	126,6	25,4	61,3	19,3	62,9	73,3
	Microarray	(140,1)	(139,2)	(39,8)	(n.d.)	(9,1)	(n.d.)	(n.d.)
Otx1 (2)	RT-PCR	139,8	130,9	24,5	56,6	19,4	67,1	93,1
	Microarray	(136,0)	(128,8)	(14,4)	(n.d.)	37,6)	(n.d.)	(n.d.)
Gfi1 (1)	RT-PCR	134,4	140,3	27,4	54,3	44,6	8,6	71,4
	Microarray	(n.d.)	(158,8)	(16,5)	(n.d.)	(n.d.)	(1,7)	(n.d.)
Gfi1 (2)	RT-PCR	163,8	112,4	22,1	59,8	49,3	6,9	56,6
	Microarray	(n.d.)	(138,4)	(58,0)	(n.d.)	(n.d.)	(23,3)	(n.d.)
RelA (1)	RT-PCR	119,2	60,6	125,3	90	137,0	12,6	5,9
	Microarray	(146,1)	(n.d.)	(n.d.)	(n.d.)	(n.d.)	(n.d.)	(< 0)
RelA (2)	RT-PCR	138,7	41,6	160,0	88,3	163,7	24,2	13,0
	Microarray	(170,1)	(n.d.)	(n.d.)	(n.d.)	(n.d.)	(n.d.)	(< 0)

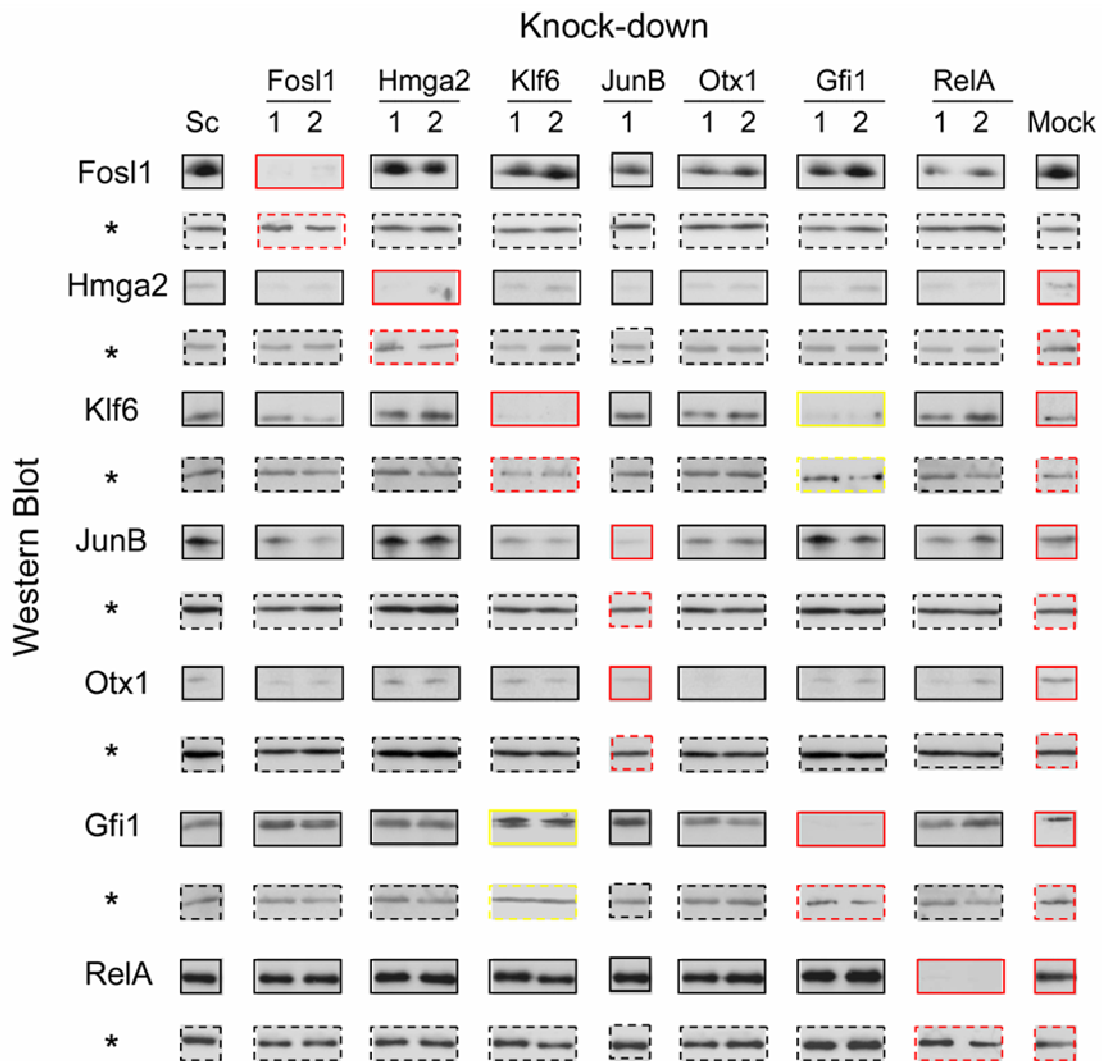


Abb. 25 Validierung der RNA-Analysen mittels Western Blot.

Transfektionen der Zellen siehe Abb. 6. Western Blot-Analysen: Nachweis der Proteinspiegel von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA (siehe Abb. 7). Ein repräsentatives Beispiel der Western Blot-Analysen aus zwei biologischen Experimenten. Ergebnisse, die in einer horizontalen Reihe mit gleicher Linienfarbe umrandet worden sind, befanden sich auf dem gleichen Blot. Gestrichelte Umrandung: Ladekontrolle β -Tubulin (*). Interne Kontrollen: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc), Zellen mit Transfektionsreagenz (Mock). (1); (2): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Wie erwartet, zeigte der Knock-down eines Transkriptionsfaktors die größte Reduktion bei seiner eigenen mRNA bzw. seinem eigenen Protein. Die Ergebnisse der Experimente mit zwei unabhängigen siRNA-Duplexen für einen Transkriptionsfaktor zeigten eine sehr hohe Übereinstimmung und Reproduzierbarkeit bei dem regulatorischen Einfluss auf die Zielgene. Die jeweiligen Kontrollansätze, Sc und Mock, zeigten keine großen Unterschiede, was für eine hohe Spezifität der gemessenen Effekte spricht (Abb. 25).

Erwartungsgemäß zeigten die Ergebnisse der qualitativen Western Blots Unterschiede zu den entsprechenden RNA-Daten. Während zum Beispiel die

Regulation der mRNA- und Proteinexpression von JunB durch die Transkriptionsfaktoren FosI1, Klf6, JunB und Otx1 übereinstimmte, regulierten die Faktoren Hmga2 und Gfi1 die JunB-mRNA aber nicht das JunB-Protein (Abb. 24, Abb. 25).

Eine noch stärkere Diskrepanz war zum Beispiel bei der Regulation der mRNA und der Proteine von RelA und Gfi1 zu finden. Klf6, JunB und Gfi1 regulierten die Expression der RelA-mRNA aber nicht des RelA-Proteins. Die Gfi1-mRNA und das Gfi1-Protein wurden durch Hmga2 und RelA auf unterschiedliche Weise beeinflusst (Abb. 24, Abb. 25).

Eine genauere Analyse der Unterschiede in der Regulation der mRNA und Proteine erfolgte nach einer umfangreichen, densitometrischen Auswertung der RT-PCR- und Western Blot-Produkte. Hierzu wurden unabhängige, biologische Replika herangezogen (Abb. 26). Wie die densitometrische Auswertung zeigt, stimmte die Regulation der mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren zu 61 % mit der Regulation der Proteinexpression überein. Aufgrund der post-transkriptionellen und post-translationalen Regulation konnte erwartungsgemäß bei keinem der untersuchten Transkriptionsfaktoren eine 100%-ige Überlappung von mRNA- und Protein-Regulation gefunden werden. Die höchste Übereinstimmung zwischen der Regulation der mRNA und den entsprechenden Proteinen war bei Klf6, JunB, Otx1 und RelA und die niedrigste Übereinstimmung bei FosI1, Hmga2 und Gfi1 zu finden (Abb. 26).

Bei den festgestellten Unterschieden zwischen der RNA- und Protein-Regulation handelte es sich sowohl um Fälle, bei denen die mRNA-Menge der Zielgene reduziert war aber nicht die Menge des Proteins, als auch um Fälle, bei denen die Proteinmenge reduziert war und nicht die mRNA-Menge (Abb. 26). Diese Unterschiede kommen möglicherweise dadurch zustande, dass die Untersuchungen nur zu einem Zeitpunkt durchgeführt wurden („Steady state“). Jeder einzelner Zeitpunkt stellt daher nur eine Momentaufnahme der zellulären Vorgänge dar (Abb. 27).

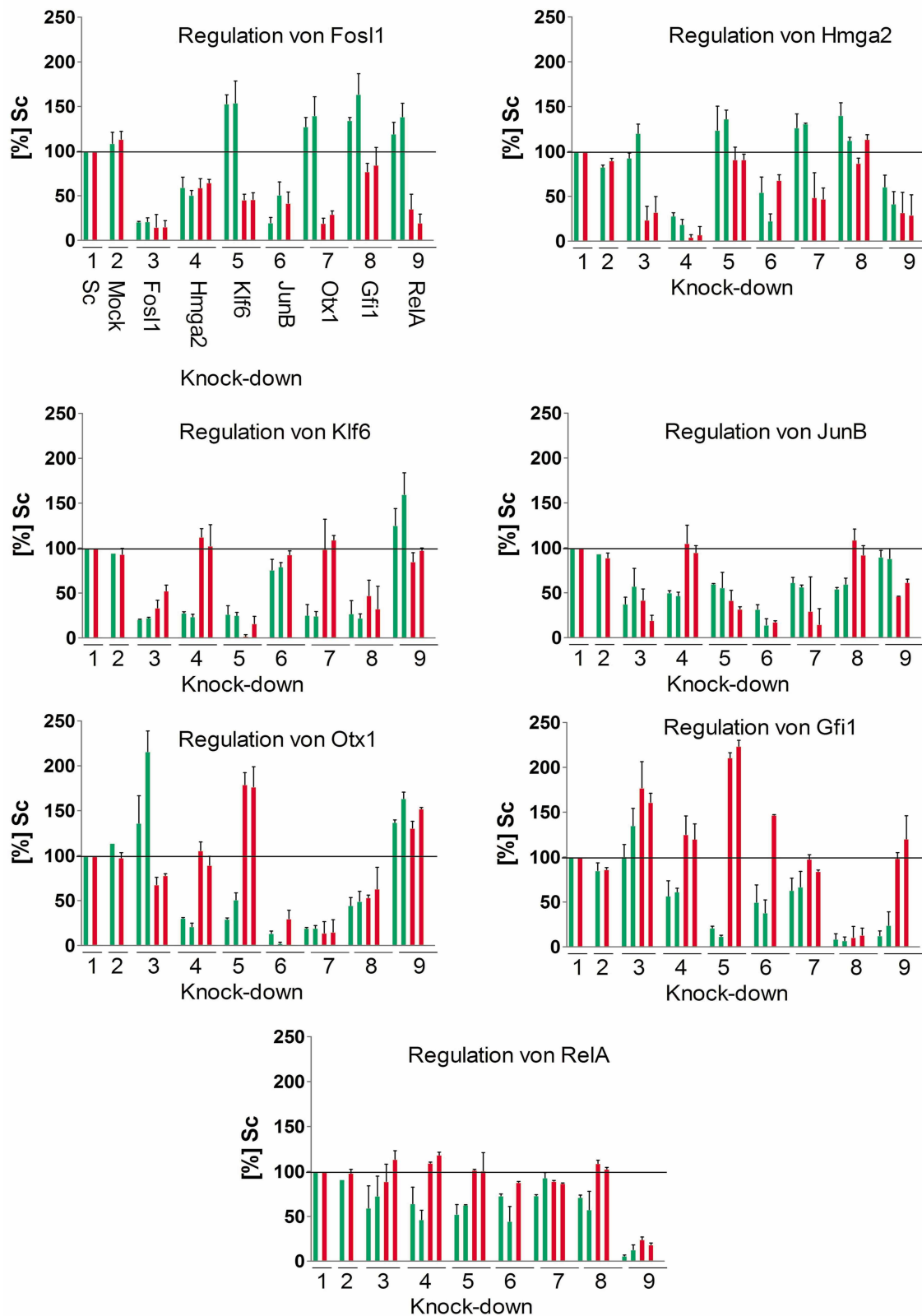


Abb. 26 Vergleich der relativen Expressionsmenge der RNA- und Proteine der Transkriptionsfaktoren Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA.

Dargestellt wurden die Ergebnisse aus den RT-PCR- und Western-Blot-Analysen als Mittelwerte aus jeweils zwei Versuchen (+/- SD). Die Ergebnisse wurden densitometrisch ausgewertet und anschließend prozentual auf die Sc-Kontrolle berechnet. Grüne Balken: RT-PCR. Rote Balken: Western Blot. Interne Kontrollen: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc), Zellen mit Transfektionsreagenz (Mock). Zwei Balken in gleicher Farbe: Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

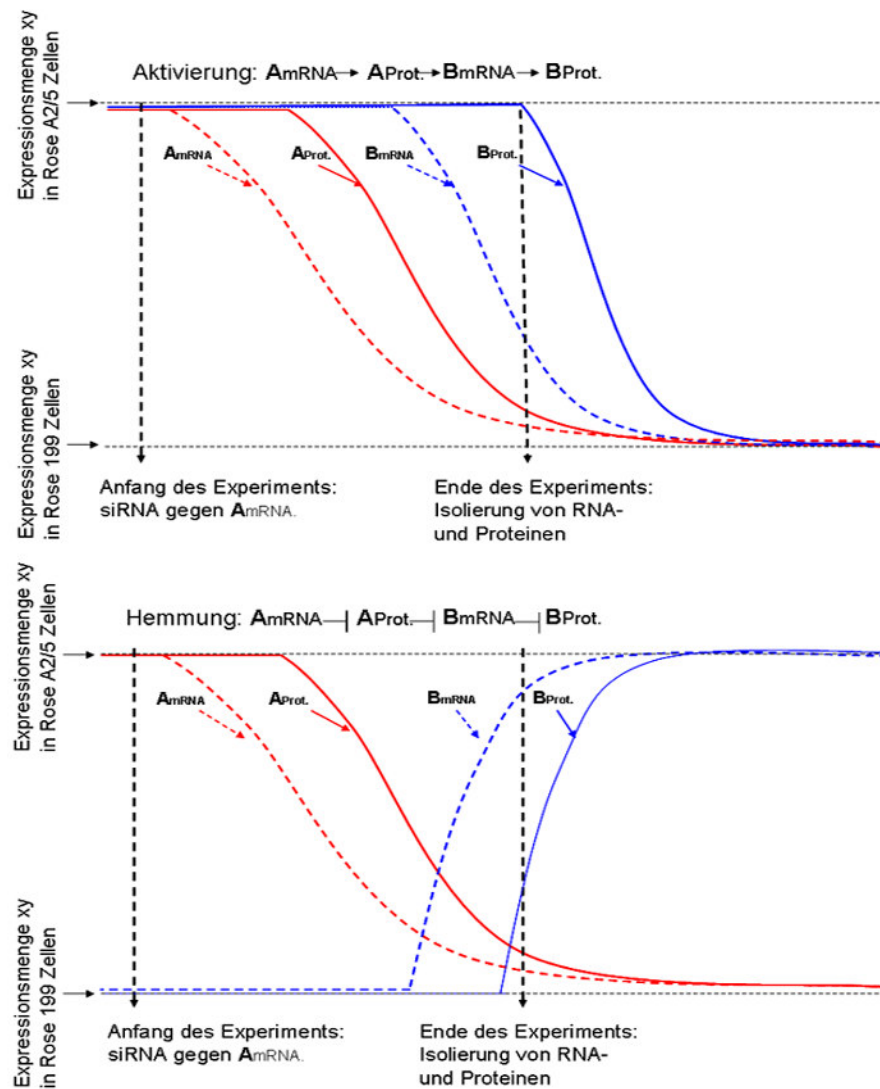


Abb. 27 Mögliche Ursachen für gemessene RNA- und Proteindiskrepanzen.

Einer der Gründe für die gemessene Diskrepanz ist in der unterschiedlichen Halbwertszeit der mRNA und Proteine zu finden. Diese sind für die hier untersuchten Transkriptionsfaktoren kurz und erlauben daher eine schnelle Regulation. Zum Beispiel beträgt die Halbwertszeit der Fos11-mRNA je nach Untersuchungsbedingungen in T-Zellen ca. 3,9 h (Raghavan, et al., 2002). Die mRNA-Halbwertszeiten von JunB, Klf6; Gfi1 und RelA liegen zwischen 0,4 h bis 7,2 h (Raghavan, et al., 2002; Yang, et al., 2003). Die Proteinhalbwertszeiten betragen für Fos11 ca. 8 h; für Klf6 ca. 9 h; für JunB ca. 7 h; für RelA ca. 4 h und Gfi1 ca. 1 h (Banck, et al., 2006; Casalino, et al., 2003; Farras, et al., 2008; Marteiijn, et al., 2007). Ein weiterer Grund für die Diskrepanz könnte eine post-translationale Regulation der Proteine sein. Eine Stabilisierung der Proteine, die in einem verspäteten Abbau

resultiert, wie es für Fos11 über pErk bekannt ist, kann die Ergebnisse zu einem spezifischen Zeitpunkt bereits erheblich beeinflusst haben (Vial and Marshall, 2003).

2.6.3 Einfluss der Raf/Mek/Erk- und PI-3-K/Akt-Signalwege auf die Expression der KRAS-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren

Um den Einfluss der ausgewählten Transkriptionsfaktoren auf ihre Zielgene besser charakterisieren zu können, sollten die Möglichkeiten der post-translationalen Regulation und funktionellen Rückkopplung näher untersucht werden.

Hierzu wurde der Einfluss der Signalkinasen Raf/Mek/Erk und PI-3-K auf die mRNA- und Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA untersucht (Abb. 28).

Wie schon in Kapitel 2.1 gezeigt, war die mRNA-Expression von Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1 und Gfi1 in Rose A2/5 Zellen im Vergleich zu den Rose 199 Zellen deutlich hochreguliert (Abb. 5A, Abb. 28A). Die Zugabe des U0126-Inhibitors zu den Rose A2/5 Zellen bewirkte bei allen Faktoren mit Ausnahme von RelA eine Abnahme der mRNA-Menge, so dass sich diese dem Niveau der Rose 199 Zellen näherte. Die Zugabe des LY294002-Inhibitors resultierte nur in einer Reduktion der Otx1-mRNA (Abb. 28A).

Wie bereits gezeigt, waren die Proteine aller untersuchten Transkriptionsfaktoren in Rose A2/5 Zellen überexprimiert (Abb. 5B, Abb. 28B). Die Überprüfung der Effekte von U0126-Inhibitor zeigte eine deutliche Abnahme der Proteinmenge von Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1 und Gfi1 aber nicht von RelA. Im Gegensatz dazu erfolgte nach der Zugabe des LY294002-Inhibitors eine deutliche Reduktion der Proteinmenge von RelA. Bei Fos11, Hmga2, Klf6 und Otx1 resultierte die Zugabe von LY294002 ebenfalls in einer Hemmung der Proteinexpression (Abb. 28B).

Für die Proteinexpression ergibt sich hieraus, dass die Regulation von JunB und Gfi1 ausschließlich durch Mek1/2-vermittelte Signaltransduktion erfolgte, während durch die PI-3-K nur RelA beeinflusst war. Die Faktoren Fos11, Hmga2, Klf6 und Otx1 wurden sowohl durch Mek1/2 als auch durch die PI-3-K reguliert (Abb. 28B). Die Diskrepanz zwischen der mRNA- und der Proteinexpression war besonders deutlich nach Zugabe von LY294002 (Abb. 28). Obwohl diese Faktoren nach KRAS-bedingter Transformation, d.h. Mek1/2-abhängig, stark überexprimiert waren, spielte die PI-3-K demnach eine sehr wichtige Rolle bei deren Regulation. Die Rolle des PI-3-K-

Signalwegs bei der translationalen Regulation ist gut bekannt (Madrid, et al., 2000; Ross, et al., 1999; Vogt, et al., 2005; Wang, et al., 2004).

Der Raf/Mek/Erk-Signalweg spielte bei der transkriptionellen Regulation eine wichtigere Rolle.

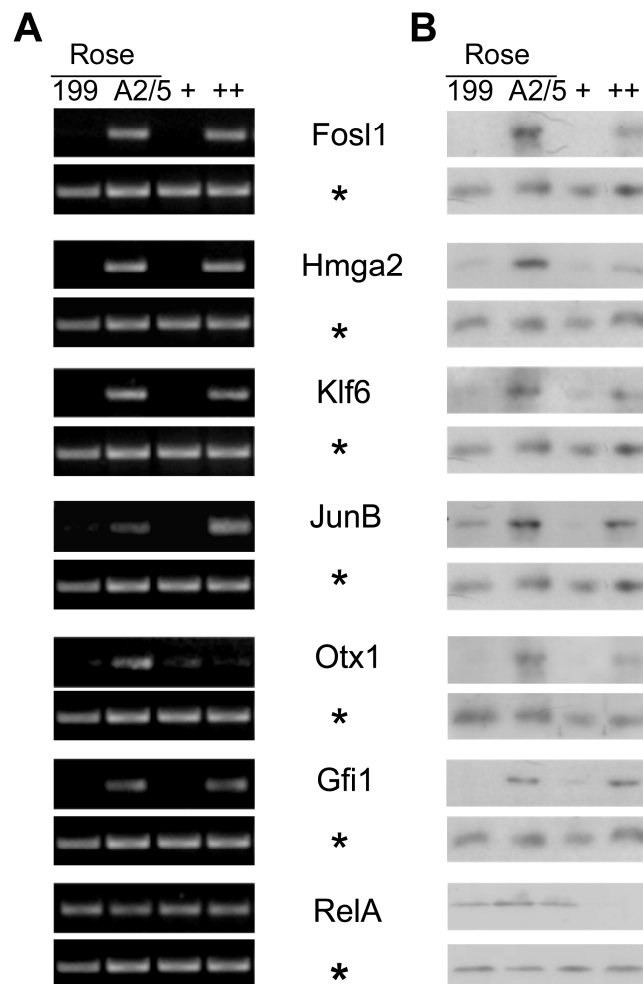


Abb. 28 Regulation der RNA- und Proteinexpression der KRAS-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren durch die Raf/Mek/Erk- und die PI-3-K-Signalkaskaden.

Transfektionen der Zellen siehe Abb. 6. Zugabe der Inhibitoren: Die Zugabe des U0126- bzw. des LY294002-Inhibitors (10µM) und die der äquivalenten Menge an DMSO (in µl) zu Rose A2/5 Zellen erfolgte 24 h nach dem Ausplattieren. Die Isolierung der Gesamt-RNA und der Kernproteine fand 48 h nach den Transfektionen bzw.- Zugabe der Inhibitoren zu den Rose A2/5 Zellen statt. **A: RT-PCR-Analysen:** Nachweis der mRNA-Expression von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA (siehe Abb. 6). (*): Endogene Kontrolle: Gapdh. **B: Western Blot-Analysen:** Nachweis der Proteinspiegel von Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA (siehe Abb. 7). (*): Ladekontrolle Histone H3. + Rose A2/5 Zellen mit U0126-Inhibitor; ++ Rose A2/5 Zellen mit LY294002-Inhibitor.

2.6.4 Einfluss der KRAS-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren auf die Raf/Mek/Erk- und PI-3-K/Akt-Signalwege

Zu den Zielgenen der Transkriptionsfaktoren gehörten viele Gene, die in der Signaltransduktion involviert sind (Tab. 3). Es stellte sich daher die Frage, ob der gegenseitige Einfluss der Transkriptionsfaktoren auf ihr jeweiliges Proteinniveau auch indirekt durch die Regulation der Signalkinasen zustande kommen könnte (Abb. 29).

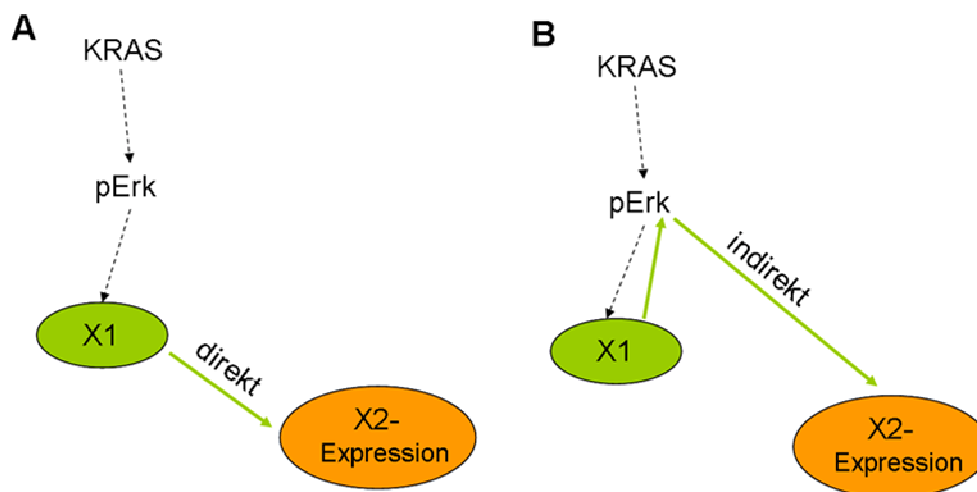


Abb. 29 Hypothetische Möglichkeiten für die Wirkungsweise von Transkriptionsfaktoren.

A: Direkter Einfluss eines Transkriptionsfaktors X1 auf die Expression des Transkriptionsfaktors X2. B: Indirekter Einfluss von X1 auf die Expression von X2 über die Regulation der Signalkinasen.

Die Untersuchung dieser Fragestellung erfolgte durch den Nachweis des Einflusses von Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA auf die Expression von pErk, pMek und pAkt mittels Western Blot-Analysen. Als Referenz für die Expression nach dem Knock-down dienten Gesamtextrakte der Sc- und Mock-Kontrollzellen (Abb. 30). Interessanterweise wurde ein starker regulatorischer Effekt von Fos11, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA auf den Aktivierungsstatus dieser Signalkinasen gefunden. Nur der Transkriptionsfaktor Hmga2 zeigte keine regulatorischen Effekte auf die untersuchten Signalwege (Abb. 30).

Die Transkriptionsfaktoren Otx1, Gfi1 und RelA beeinflussten sowohl die Phosphorylierungsspiegel von pErk und pMek als auch die von pAkt (Abb. 30). Die Phosphorylierung von pErk, pMek und pAkt nahm nach dem Knock-down dieser Transkriptionsfaktoren noch weiter zu, was für einen hemmenden Einfluss von Otx1, Gfi1 und RelA auf die untersuchten Signaltransduktionswege in Rose A2/5 Zellen

sprach. Im Gegensatz dazu beeinflussten die Faktoren Fos1, Klf6 und JunB die Mek1/2-Phosphorylierungsspiegel. Die Phosphorylierung von pMek nahm nach dem Knock-down dieser Transkriptionsfaktoren ab, was für deren aktivierenden Einfluss auf Mek1/2 sprach (Abb. 30).

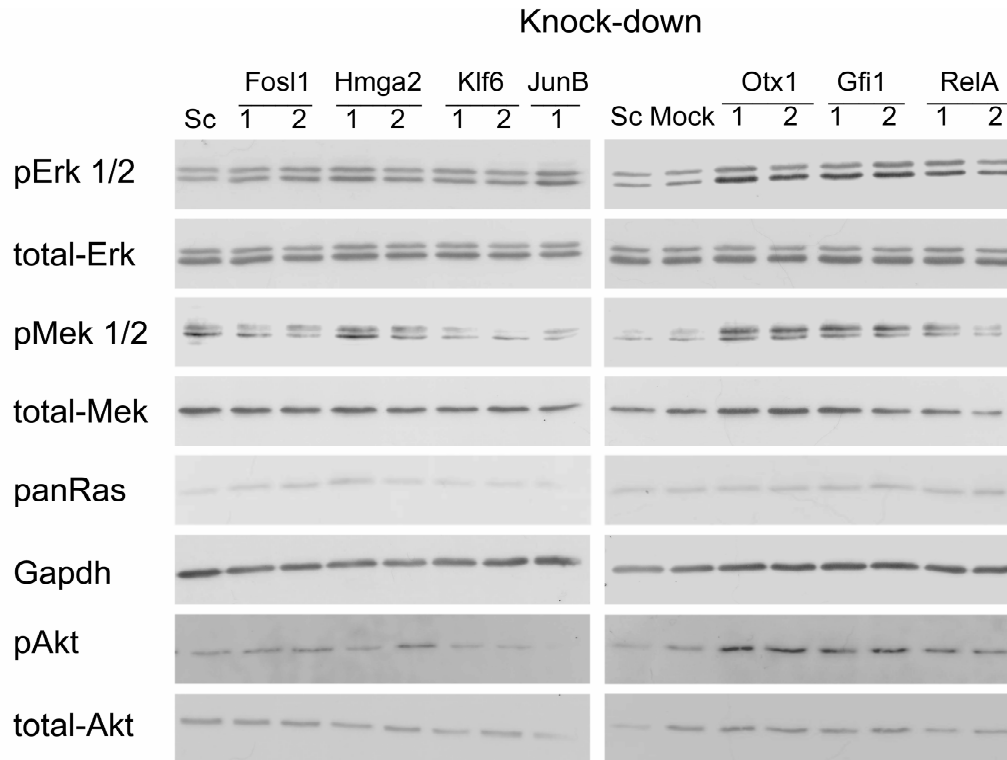


Abb. 30 Regulatorischer Einfluss der ausgewählten Transkriptionsfaktoren auf die Signaltransduktion.

Transfektionen der Zellen siehe Abb. 6. Western Blot-Analysen: Nachweis des Aktivierungszustandes von pErk, pMek, pAkt und der Proteinspiegel von panRas mittels primärer Antikörper im Western Blot nach der SDS-PAGE mit je 40 µg der Gesamtproteine isoliert 48 h nach Transfektionen aus Rose A2/5 Zellen. Als Kontrolle für die Expression von pErk, pMek und pAkt diente die Expression der jeweiligen nicht-phosphorylierten Proteine und für panRas der Nachweis von Gapdh. Gezeigt ist jeweils ein exemplarisches Beispiel der Western Blot-Analysen aus zwei biologisch unabhängigen Versuchen. Interne Kontrollen: siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz (Sc), Zellen mit Transfektionsreagenz (Mock). (1); (2): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Die Expression von Fos1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA war von den Raf/Mek/Erk und PI-3-K-Signalwegen abhängig (Abb. 28). Die Transkriptionsfaktoren Fos1, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA regulierten ihrerseits die Raf/Mek/Erk und PI-3-K-Signalwege (Abb. 30). Dies kann als kompensatorische Regulation interpretiert werden. Die Existenz der kompensatorischen Regulation könnte die Ursache für die partiellen Effekte nach dem Knock-down der Transkriptionsfaktoren sein und der Grund für Aufrechterhaltung der neoplastischen Transformation der Rose A2/5 Zellen.

3 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von KRAS-abhängig überexprimierten Transkriptionsfaktoren (Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA) auf die neoplastische Transformation in einem Zellkulturmodell für Ovarialtumore untersucht. Die systematische Eliminierung der Transkriptionsfaktoren mittels RNA-Interferenz aus KRAS-transformierten Rose A2/5 Zellen ergab, dass jeder dieser Transkriptionsfaktoren partiell zur Aufrechterhaltung des neoplastischen Phänotyps beitrug. Die Proliferationsanalysen zeigten zwei funktionelle Gruppierungen innerhalb der Transkriptionsfaktoren. Otx1, Gfi1 und RelA regulierten den Zellzyklus, was zu einer partiellen Proliferationshemmung der Rose A2/5 Zellen führte. Fosl1, Hmga2, Klf6 und JunB zeigten dagegen eine spezifische Regulation der KRAS-vermittelten Ankerabhängigkeit. Die Charakterisierung der Zielgene mittels Microarray-Analysen und die darauf basierende Überprüfung eines bioinformatischen Modells der wahrscheinlichen Interaktionen verdeutlichten die Funktionsweise dieser Transkriptionsfaktoren in Netzwerken und bestätigten die Existenz der zwei Gruppierungen. In Western-Blot-Analysen wurde eine starke, gegenseitige Regulation und Abhängigkeit zwischen den transkriptionellen Netzwerken und der zytoplasmatischen Signaltransduktion nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten somit auf die Existenz einer kompensatorischen Regulation hin, die die KRAS-bedingte neoplastische Transformation der Rose A2/5 Zellen aufrechterhält.

3.1 Vergleich zwischen normalen Bedingungen, den Tumorzellen und dem Rose Zellsystem

Die Transkriptionsfaktoren Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA werden in normalen ausdifferenzierten Körperzellen nicht exprimiert. Deren Expression findet nur unter streng regulierten zelltyp- und prozessspezifischen Bedingungen sowie während der Embryogenese statt. Die Reaktivierung der untersuchten Transkriptionsfaktoren ist in verschiedenen Tumorarten beschrieben und korreliert mit Malignität und Invasivität. Die Zusammenhänge mit der KRAS-bedingten Expression und Regulation sind für Fosl1, Hmga2, Klf6, JunB, Gfi1 und RelA bekannt. Der Zusammenhang zwischen der KRAS-bedingten Transformation und der Otx1-Expression stellt einen neuen Zusammenhang dar, der in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben wurde (Tab. 6).

Tab. 6 Vergleich der normalen und der tumorabhängigen Expression und Funktion von Fos11, Hmga2, Klf6, JunB, Otx1, Gfi1 und RelA im Rose Zellsystem mit publizierten Ergebnissen anderer Tumore und Zelllinien. (*): Literaturergebnisse.

TF	Normale Bedingungen* (Expression, Regulation, Funktion)	Tumore* (Expression, Regulation, Funktion)	Rose Zellsystem (Expression, Regulation, Funktion)	Literatur*
Fos11/ JunB	<ul style="list-style-type: none"> Embryogenese Epithelial-mesenchymale Interaktionen 	<ul style="list-style-type: none"> Raf/Mek/Erk-spezifische Expression und Regulation Transformation <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> (3D) Proliferation Proto-Onkogene 	<ul style="list-style-type: none"> Fos11/JunB-mRNA: KRAS-abhängig (Abb. 5, Abb. 28, Tab. 4) Fos11-Protein: KRAS/Mek1/2- und PI-3-K-abhängig (Abb. 28) JunB-Protein: KRAS-abhängig (Abb. 28) partielle Reversion der neoplastischen Transformation (Abb. 9, Tab. 2) (3D) Proliferation (Abb. 15) 	(Battista, et al., 1998; Belguise, et al., 2005; Casalino, et al., 2007; Casalino, et al., 2003; Crish, et al., 2002; Hurd, et al., 2002; Leaner, et al., 2009; van Dam and Castellazzi, 2001; Watanabe, et al., 2005)
Hmga2	<ul style="list-style-type: none"> Embryogenese Mesenchym 	<ul style="list-style-type: none"> Brust, Pankreas, Lunge, Magen, Schilddrüse, u.a. Raf/Mek/Erk- und PI-3-K-abhängige Expression Ras-induzierte EMT 	<ul style="list-style-type: none"> Hmga2-mRNA: KRAS-abhängig (Abb. 5, Abb. 28, Tab. 4) Hmga2-Protein: KRAS/Mek1/2- und PI-3-K-abhängig (Abb. 28) partielle Reversion der neoplastischen Transformation (Abb. 9, Tab. 2) (3D) Proliferation (Abb. 15) 	(Abe, et al., 2003; Ayoubi, et al., 1999; Belge, et al., 2008; Berlingieri, et al., 1995; Chiappetta, et al., 2008; Hristov, et al., 2009; Langelotz, et al., 2003; Manfioletti, et al., 1991; Meyer, et al., 2007; Motoyama, et al., 2008; Rogalla, et al., 1996; Rogalla, et al., 1997; Sezer, et al., 2000; Watanabe, et al., 2009; Zhou, et al., 1995)
Klf6	<ul style="list-style-type: none"> Proliferation anti-apoptotisch 	<ul style="list-style-type: none"> KRAS-abhängige Expression Lunge, Magen, u.a. Invasion Proliferation Tumorprogression <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Klf6-mRNA: KRAS-abhängig (Abb. 5, Abb. 28, Tab. 4) Klf6-Protein: KRAS/Mek1/2- und PI-3-K-abhängig (Abb. 28) partielle Reversion der neoplastischen Transformation (Abb. 9, Tab. 2) (3D) Proliferation (Abb. 14) 	(Black, et al., 2001; Cho, et al., 2005; DiFeo, et al., 2006; Ito, et al., 2004; Narla, et al., 2005; Narla, et al., 2005; Sangodkar, et al., 2009; Yea, et al., 2008)
Otx1	<ul style="list-style-type: none"> Embryogenese Neuroektoderm 	<ul style="list-style-type: none"> Gehirn 	<ul style="list-style-type: none"> Otx1-mRNA: KRAS/Mek1/2- und PI-3-K-abhängig (Abb. 5, Abb. 28, Tab. 4) Otx1-Protein: KRAS/Mek1/2- und PI-3-K-abhängig (Abb. 28) partielle Reversion der neoplastischen Transformation (Abb. 9, Tab. 2) (2D) Proliferation (Abb. 15) Zellzyklus-Regulator (Abb. 18) 	(Acampora, et al., 1999; de Haas, et al., 2006; Kanzler, et al., 1994)
Gfi1	<ul style="list-style-type: none"> Embryogenese Transkriptioneller Repressor Zellzyklus-Regulator anti-apoptotisch anti-inflammatorisch 	<ul style="list-style-type: none"> Prostata Aktivierung durch pErk 	<ul style="list-style-type: none"> Gfi1-mRNA: KRAS-abhängig (Abb. 5, Abb. 28, Tab. 4) Gfi1-Protein: KRAS/Mek1/2-abhängig (Abb. 28) partielle Reversion der neoplastischen Transformation (Abb. 9, Tab. 2) (2D) Proliferation (Abb. 15) Zellzyklus-Regulator (Abb. 18) 	(Dwivedi, et al., 2007; Gilks, et al., 1993; Grassme, et al., 2006; Grimes, et al., 1996; Grimes, et al., 1996; Karsunky, et al., 2002; McGhee, et al., 2003; Wallis, et al., 2003; Zweidler-Mckay, et al., 1996)
RelA	<ul style="list-style-type: none"> Embryogenese Wundheilung Proliferation anti-apoptotisch anti-inflammatorisch Zellmigration 	<ul style="list-style-type: none"> Brust, Lunge KRAS-abhängige und -unabhängige Expression Aktivierung durch Phosphorylierung über PI-3-K/pAkt Proto-Onkogen 	<ul style="list-style-type: none"> RelA-mRNA: PI-3-K-abhängig (Abb. 5, Abb. 28, Tab. 4) RelA-Protein: KRAS/Mek1/2- und PI-3-K-abhängig (Abb. 28) partielle Reversion der neoplastischen Transformation (Abb. 9, Tab. 2) (2D) Proliferation (Abb. 15) Zellzyklus-Regulator (Abb. 18) 	(Karin, et al., 2002; Lerebours, et al., 2008; Lin, et al., 2009; Madrid, et al., 2000)

Alle untersuchten Transkriptionsfaktoren trugen essenziell zur KRAS-bedingten neoplastischen Transformation von Rose A2/5 Zellen bei, wie an der partiellen Reversion der EMT und des KRAS-abhängig deregulierten genetischen Programms zu sehen war (Tab. 6). Für die Transkriptionsfaktoren Fos1, JunB und RelA ist die Funktion als Onkogene bekannt. Eine genauere Untersuchung der Funktion von Klf6, Otx1 und Gfi1 in anderen Tumormodellen *in vitro* und *in vivo* kann Aufschluss darüber geben, ob diese Faktoren ebenfalls als Onkogene fungieren können.

3.2 Modell der Wechselwirkungen zwischen den transkriptionellen Netzwerken und der zytoplasmatischen Signaltransduktion

Die Erstellung von Modellen auf der Basis experimenteller Datensätze stellt einen relativ neuen Ansatz dar, um komplexe Vorgänge in der Zelle darzustellen. Aus den experimentellen Ergebnissen lassen sich die wahrscheinlichsten Interaktionen nicht intuitiv erfassen. Das Herausfiltern der möglichen realen Regulationen zwischen den gemessenen Komponenten durch Erstellung von funktionellen Modellen stellt somit eine wichtige Voraussetzung für weitere funktionelle Analysen dar. Die Vorhersagen, die innerhalb der Modelle getroffen werden, schränken ebenfalls die aufwendigen Promotorbindungsstudien und Protein-Protein-Bindungsanalysen ein. Im Rahmen der bestehenden Kooperation mit Stefan Legewie und Nils Blüthgen wurde daher ein um die Proteindaten erweitertes Modell erstellt (Abb. 31, vgl. Abb. 23, S. 40-42). Dieses neue Modell basiert auf den RT-PCR- und Western Blot-Ergebnissen aus Abb. 24, Abb. 25, Abb. 26, Abb. 28, Abb. 30 und Tab. 4. Interessanterweise waren 50 % der Vorhersagen keine Zusammenhänge, die in den Experimenten festgestellt wurden. Ebenfalls war eine Vielzahl der experimentell gemessenen Regulationen nicht in dem berechneten Modell vertreten. Sie stellten daher aufgrund reiner Statistik keine wahrscheinlichen Interaktionen zwischen den untersuchten Komponenten dar (Abb. 31).

Wie man dem Modell entnehmen kann, korrelierte erwartungsgemäß die mRNA-Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren positiv mit deren Proteinexpression. Die Netzwerk-Komponenten wurden sowohl auf dem transkriptionellen als auch auf dem translationalen Niveau reguliert (Abb. 31).

Aus dem Modell geht des Weiteren hervor, dass die Komponenten der zytoplasmatischen Signaltransduktion und die ausgewählten Transkriptionsfaktoren in einer Netzwerkstruktur mitorganisiert sind (Abb. 31). Die Komplexität

transkriptioneller Vorgänge ist bekannt (Greenbaum, et al., 2002; Suzuki, et al., 2009). Es ist zudem bekannt, dass eine Störung der Funktionsweise eines Proteins große Auswirkungen sowohl auf die mRNA- als auch auf die Proteinexpression mit sich bringt (Hatzimanikatis, et al., 1999).

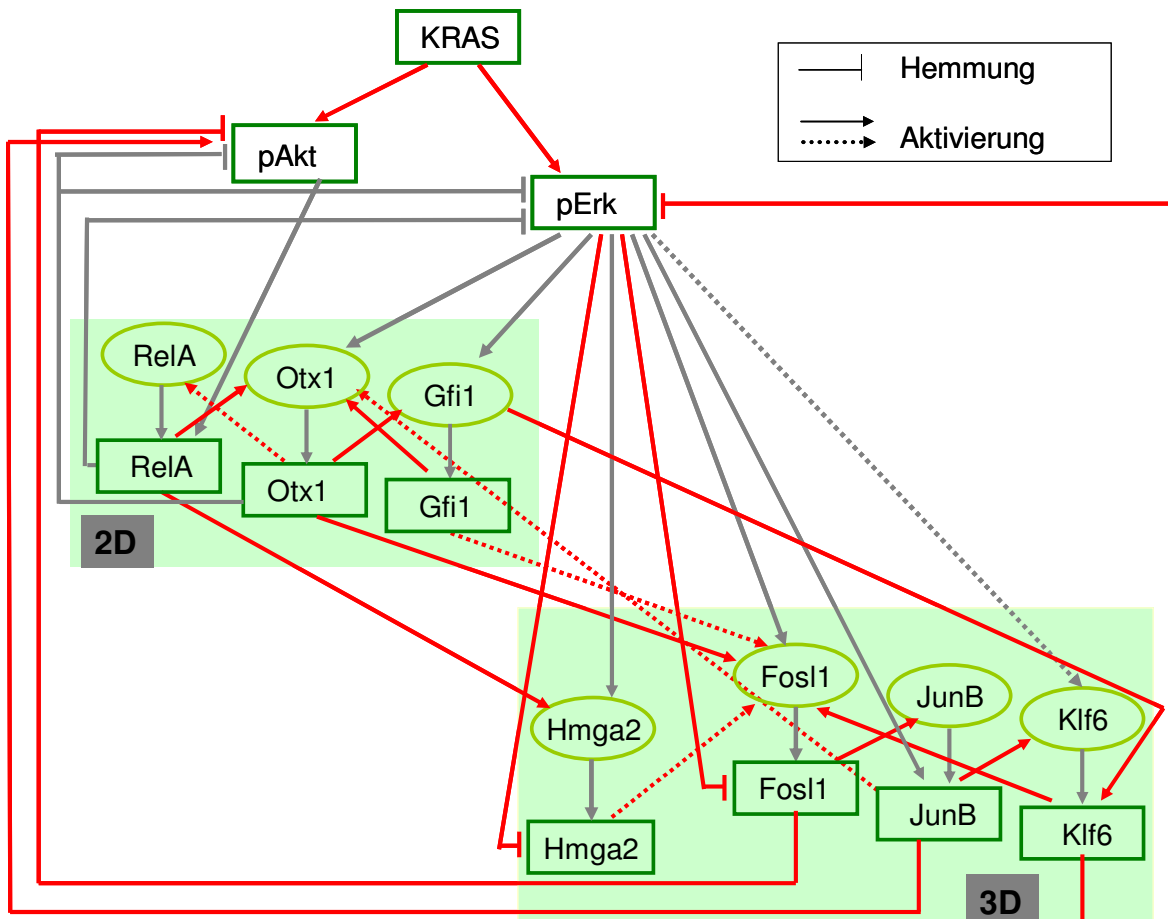


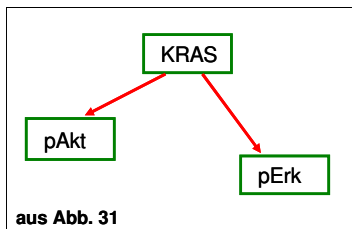
Abb. 31 Modell der Wechselwirkungen zwischen transkriptionellen Netzwerken und der zytoplasmatischen Signaltransduktion auf Grundlage der RNA-Interferenzstudien und Microarray-Analysen.

Das Modell basiert auf den RT-PCR- und Western Blot-Daten, die im Rahmen dieser Arbeit generiert worden sind (Abb. 24, Abb. 25, Abb. 26, Abb. 28, Abb. 30, Tab. 4). Für die Berechnung erfolgte eine densitometrische Auswertung der RT-PCR- und Western Blot-Produkte und deren nachfolgende prozentuale Berechnung auf die jeweilige Sc-Kontrolle. Kreise: mRNA. Kästchen: Proteine. Rote Pfeile: Zusammenhänge, auf die man nicht direkt aus den RT-PCR- und Western Blot-Daten schließen kann. Graue Pfeile: Zusammenhänge, die in RT-PCR bzw. im Western Blot als Teil der Ergebnisse nachgewiesen wurden. Durchgehende Pfeile: statistisch hohe Wahrscheinlichkeit für eine Interaktion. Gestrichelte Pfeile: statistisch niedrige Wahrscheinlichkeit für eine Interaktion. 2D: Ankerabhängige Proliferation auf Zellkulturplastik. 3D: Ankerunabhängige Proliferation auf PolyHEMA. Das erweiterte Modell wurde von Dr. Stefan Legewie und Dr. Nils Blüthgen berechnet (HU/Charite Berlin).

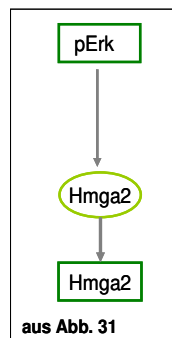
Die kürzlich publizierte Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen 52 Transkriptionsfaktoren zeigte beispielhaft eine Kooperation aller dieser Faktoren in der Hemmung bestimmter Phänotypen (Suzuki, et al., 2009). Die Schlussfolgerung aus dieser Studie ist, dass ein einzelner Transkriptionsfaktor nicht ausreicht, um die Differenzierung der Zellen voranzutreiben. Diese Studie widerspricht in keiner Weise den Erkenntnissen aus Embryogenese, die zeigen, dass das Fehlen eines Transkriptionsfaktors, wie zum Beispiel RelA, JunB, Fos1 oder Hmga2, letal ist (Beg, et al., 1995; Schorpp-Kistner, et al., 1999; Schreiber, et al., 2000). Diese Untersuchungen unterstützen somit die Erkenntnisse dieser Arbeit, die die Existenz einer dynamischen Netzwerkstruktur vorschlagen (Abb. 31).

Die Experimente und das Modell ergänzen sich und tragen zum Verständnis der Aufrechterhaltung der neoplastischen Transformation der Rose A2/5 Zellen bei. Somit zeigt das Modell Unterschiede zwischen den untersuchten Transkriptionsfaktoren, die sich bereits aus den funktionellen Analysen heraus stellten (Abb. 15, Abb. 18). Interessanterweise werden die Transkriptionsfaktoren in dem Modell ebenfalls in zwei Gruppierungen unterteilt (Abb. 31). Während die Faktoren Otx1, Gfi1 und RelA mit hoher Wahrscheinlichkeit die Expression der übrigen Faktoren Fos1, Hmga2, Klf6, und JunB direkt aktivieren können, ist die Wahrscheinlichkeit für einen umgekehrten Einfluss entweder sehr gering oder gar nicht vorhanden. Daraus geht hervor, dass die Faktoren RelA, Otx1, Gfi1 den Faktoren Fos1, Hmga2, JunB und Klf6 übergeordnet sind und diese stark beeinflussen (Abb. 31).

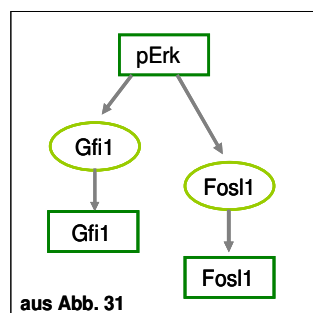
Das Modell bestätigt auch die Regulation der zytoplasmatischen Signaltransduktion durch KRAS-abhängig überexprimierte Transkriptionsfaktoren, die als kompensatorische Regulation interpretiert wird (Abb. 28, Abb. 30, Abb. 31). Die Transformation der Rose A2/5 Zellen wird durch ein Wechselspiel zwischen Aktivierung und Hemmung einzelner Komponenten aufrechterhalten. Die Kommunikation zwischen den transkriptionellen Netzwerken und der zytoplasmatischen Signaltransduktion basiert somit auf Rückkopplungsreaktionen, die den Expressionsstatus der Komponenten im Gleichgewicht halten (Abb. 31). Diese Art von Regulationen ist vermutlich der Grund für die Aufrechterhaltung der Tumoreigenschaften von Rose A2/5 Zellen.



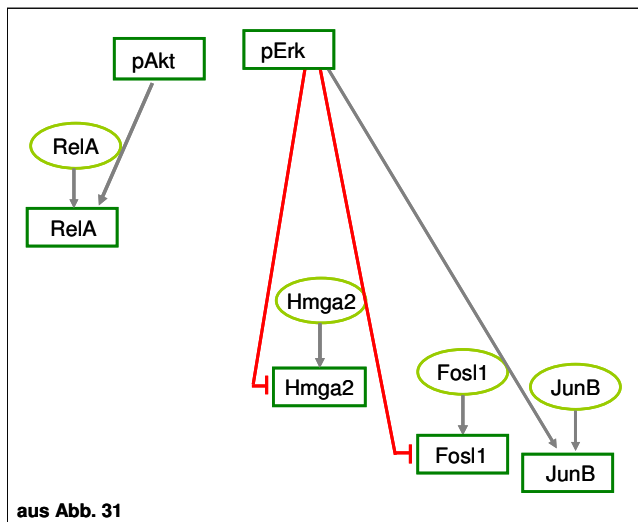
Das Modell spiegelt die gleichzeitige pErk- und pAkt-Aktivierung durch KRAS wider, die sehr gut bekannt ist und als Voraussetzung für die Transformation der Zellen gilt (Madrid, et al., 2000; Mayo, et al., 1997; Nesterov, et al., 2004; Pervin, et al., 2003; Rodriguez-Viciano, et al., 1994; Xin and Deng, 2005; Yan, et al., 1998).



Die Hmga2-mRNA-Expression wird durch pErk aktiviert, möglicherweise durch zwischengeschaltete Zielgene von pErk, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Da sich die Interaktionen in dem Modell aus Abbildung 31 nur auf die gemessenen Komponenten beschränken, können durchaus zwischengeschaltete Faktoren existieren. Da die Transkriptionsfaktoren Sp1 und CTF/NF-1 direkt an dem Hmga2-Promotor binden (Rustighi, et al., 1999), aktivieren sie möglicherweise auch Hmga2 in Rose A2/5 Zellen. Die Rose A2/5 und Rose 199 Zellen unterschieden sich nicht in der Expression der Sp1-mRNA. Interessanterweise resultierte der Knock-down von Fos1 jedoch in einer Abnahme der Sp1-mRNA. Das spricht für einen hohen endogenen Spiegel von Sp1 in Rose 199 Zellen (Microarray-Daten, siehe Anhang). Es wäre daher denkbar, dass Fos1 über die Aktivierung von Sp1 die Hmga2-Expression reguliert. Wie die Microarray-Analysen zeigen war neben Sp1 auch der Transkriptionsfaktor Klf10 in Rose A2/5 Zellen überexprimiert. Klf10 gehört zur Sp/Klf Familie, deren Mitglieder mit unterschiedlicher Affinität zu den gleichen Sequenzen (GGGCGG), „Sp1-sites“, binden (Black, et al., 2001; Kingsley and Winoto, 1992). Daher ist es nicht ausgeschlossen, dass Klf10 ebenfalls die Hmga2-Expression reguliert. Die genauen Faktoren, die die Aktivierung von Hmga2 in Rose A2/5 veranlassen sind weitgehend ungeklärt und müssen in weiteren Studien analysiert werden.



Die Zusammenhänge zwischen der mRNA-Expression von Fos1, Gfi1 und dem Raf/Mek/Erk-Signalweg, die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen wurden, sind bereits bekannt (Karsunky, et al., 2002; Vial and Marshall, 2003).

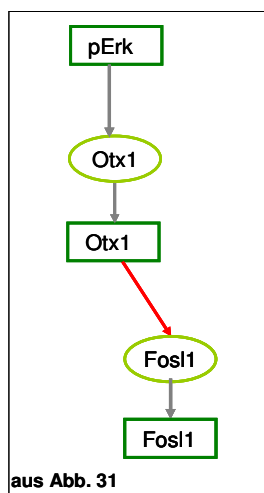


Der positive Einfluss von pErk auf JunB-Protein und von pAkt auf RelA-Protein ergibt sich aus dem Modell und aus den Experimenten (Abb. 28, Abb. 31).

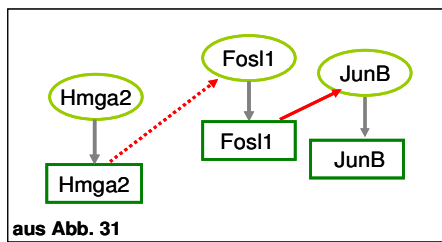
Fosl1, Hmga2 und JunB werden durch pErk aktiviert, was ebenfalls aus dem Modell und experimentellen Daten hervorging (Abb. 28, Abb. 31).

Für die Regulation der Hmga2- und

Fosl1-Proteine durch pErk sagt die mathematische Berechnung zusätzlich eine Hemmung voraus, die experimentell nicht nachgewiesen wurde. Es ist denkbar, dass diese Hemmung zeitlich verzögert auf die Aktivierung folgt. Die Erstellung einer Kinetik zum Einfluss von pErk auf Fosl1 und Hmga2 wäre für die Untersuchung des potentiellen Wechsels zwischen Aktivierung und Hemmung hilfreich. Eine solche Regulation der Proteine ist generell bekannt. Ein gut untersuchtes Beispiel für eine Regulation der translationalen Aktivität durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung stellt der Transkriptionsfaktor CREB dar. CREB wird durch die Proteinkinase A phosphoryliert und damit aktiviert. Seine Inaktivierung durch Dephosphorylierung findet mit einer Verzögerung durch die Proteinphosphatase 1 statt (Hunter, 1995). Auch pAkt kann direkt die Zielproteine phosphorylieren. Die direkte Phosphorylierung ist zum Beispiel für die NF-kappaB-Untereinheit RelA bekannt, wobei RelA in seiner Funktion aktiviert wird (Madrid, et al., 2000).

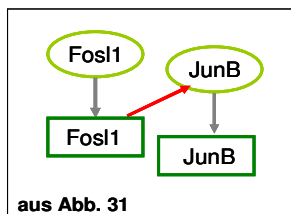


Otx1 wurde als direkter Aktivator von Fosl1 dargestellt. Diese Interaktion ist noch nicht beschrieben, findet jedoch vermutlich über zwischengeschaltete Ziele von Otx1 statt. Für diese Option spricht, dass der Knock-down von Otx1 eine Überexpression von c-Jun verursachte, der als Aktivator von Fosl1 bekannt ist (Microarray-Daten, siehe Anhang; (Adiseshaiah, et al., 2005).



Hmga2 ist als ein direkter Aktivator der Expression von Fosl1 und JunB beschrieben (Vallone, et al., 1997). Es wurde jedoch eine geringe Wahrscheinlichkeit für eine Aktivierung von Fosl1 und JunB durch Hmga2 berechnet. Dies hängt

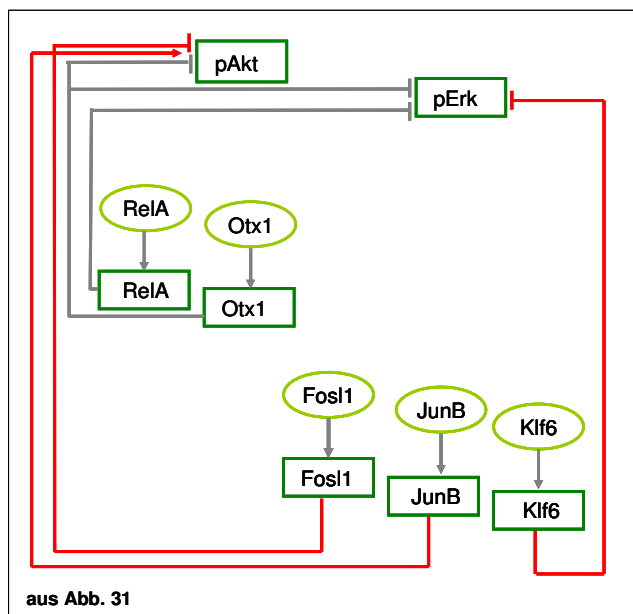
vermutlich mit der Hmga2-Funktion als architektonischer Transkriptionsfaktor zusammen. Hmga2 bindet überwiegend an AT-reiche Regionen in Promotor- und Enhancer-Bereichen, was zu einer Konformationsänderung des Chromatins führt. Dadurch wird die Bindung von weiteren spezifischen Transkriptionsfaktoren erleichtert. Somit kann Hmga2 die Initiation der Transkription nur indirekt über die Bildung von großen Proteinkomplexen an entwundenen DNA-Bereichen einleiten (Hock, et al., 2007; Reeves and Beckerbauer, 2001).



Die Ergebnisse dieser Arbeit schlagen eine Aktivierung von JunB durch Fosl1 vor, die in der Form bereits beschrieben wurde (Casalino, et al., 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen, ähnlich stark partiell ausgeprägten Effekte von

Fosl1 und JunB können durch eine flexible Dimerisierung mit alternativen Bindungspartnern zustande kommen (Abb. 9, Abb. 14, Abb. 19). Die Mitglieder der Jun-Familie und Fos-Familie bilden Dimere und binden an gleiche DNA-Sequenzen. Die Mitglieder der Ap1-Familie bilden Heterodimere, wobei Fos-Proteine nur mit Jun-Proteinen dimerisieren, während die Jun-Proteine auch Homodimere bilden können (Hirai, et al., 1989; O'Shea, et al., 1992). Die Dimerisierung innerhalb der Fos und Jun-Mitglieder ist flexibel und hängt unter anderem vom Transformationsstatus der Zellen ab (Bakiri, et al., 2002; Zoumpourlis, et al., 2000). Daher stehen nach dem Knock-down von Fosl1 bzw. JunB andere Mitglieder der AP-1-Familie für die Interaktionen zur Verfügung. In den Rose A2/5 Zellen wurden c-Jun und Fosl2 nicht differenziell exprimiert, während die JunD-Expression stark herunterreguliert war (Microarray-Daten, siehe Anhang). Der Knock-down von Fosl1 und JunB resultierte in einer noch stärkeren Herunterregulation der JunD-mRNA, was auf einen hohen endogenen Spiegel von JunD in Rose 199 Zellen hindeutet. Eine fehlende Expression von JunD in immortalisierten Zellen verursacht eine erhöhte Proliferation (Weitzman, et al., 2000), was möglicherweise die Entstehung von partiellen Effekten begünstigt. Der hohe endogene Spiegel von JunD in Rose 199 Zellen ermöglicht die Bildung vom alternativen Fosl1-JunD-Komplex in Abwesenheit von JunB. Die Bildung

von Homodimeren durch JunB und JunD in Abwesenheit von Fos11 ist ebenfalls möglich. Die Dimerisierung von JunB und Fos12 in Abwesenheit von Fos11 ist dagegen eher unwahrscheinlich. Der Knock-down der untersuchten Transkriptionsfaktoren resultierte nicht in einer Änderung im Expressionsspiegel von Fos12. Die Expression der zwei weiteren Mitglieder der Fos-Familie, c-Fos und FosB, sowie die Expression weiterer potentieller Bindungspartner von AP-1, wie ATF-2 (Zoumpourlis, et al., 2000), wurden im Rahmen der Microarray-Analysen nicht untersucht. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass eine Dimerisierung von JunB mit diesen Proteinen existiert.

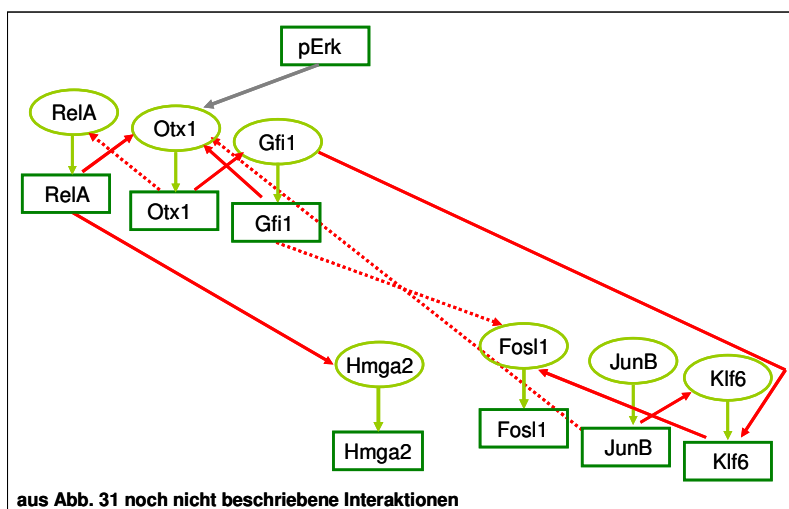


Die Transkriptionsfaktoren RelA, Otx1, Klf6 hemmen pErk während pAkt durch Otx1 und Fos11 gehemmt wurde. Für JunB wurde ein aktivierender Einfluss auf pAkt gezeigt (Abb. 30, Abb. 31). Die KRAS-abhängig überexprimierten Transkriptionsfaktoren übten somit Einfluss auf die zytoplasmatische Signaltransduktion und bildeten die Schaltstelle zwischen der PI-3-K- und der Raf/Mek/Erk-

Signalkaskade. Die Existenz dieser Schaltstelle wird bereits seit längerer Zeit vermutet (Moelling, et al., 2002; Rommel, et al., 1999; Sers, et al., 2002; Tchernitsa, et al., 2004; Zimmermann and Moelling, 1999). Die Funktion von RelA als solche Schaltstelle, die die Regulation zwischen dem PI-3-K- und dem Raf/Mek/Erk-Signalweg vermittelt, ist bereits bekannt. Dies zeigten Studien mit dem Inhibitor Hexamethylen-bis-Acetamid (HMBA), der gleichzeitig beide Signaltransduktionswege hemmen kann, was über die Inaktivierung von RelA zur Einleitung der Apoptose führt (Dey, et al., 2008). Für Klf5, der zur gleichen Proteinfamilie gehört, wie Klf6, wurde eine aktivierende Funktion auf Erk gezeigt (Black, et al., 2001; Liu, et al., 2009). Für Klf6 wäre eine ähnliche Funktion daher nicht ausgeschlossen.

Es ist denkbar, dass die Transkriptionsfaktoren den Einfluss auf pErk und pAkt indirekt über Phosphatasen ausüben. Eine solche Möglichkeit wurde bei der Regulation von pErk bereits gezeigt (Bluthgen, et al., 2009). Die Hemmung bzw. die

Aktivierung der Kinasen über Phosphorylierung und Dephosphorylierung stellt eine Regulation dar, die unter normalen zellulären Bedingungen zum An- und Abschalten der Signaltransduktionswege und somit zur Regulation der Apoptose, Proliferation und Differenzierung dient. Dabei findet eine gegenseitige Regulation zwischen den Signalkaskaden über Phosphatasen statt (Bhalla and Iyengar, 1999; Hunter, 1995). Die „Dual-specificity phosphatases“ (Dusps) hemmen den Raf/Mek/Erk-Signalweg durch Dephosphorylierung von pErk. Diese Hemmung ist bei der Regulation von pro- und anti-inflammatorischen Antwort der Zellen essenziell. Dabei werden die Dusps beinahe gleichzeitig zur Aktivierung von pErk exprimiert (Bluthgen, et al., 2009; Pervin, et al., 2003; Salojin and Oravecz, 2007). Zu den Zielgenen der hier untersuchten Transkriptionfaktoren gehören interessanterweise Dusps. Zum Beispiel wird Dusp 5 in Rose A2/5 Zellen überexprimiert und der Knock-down von Fos11, Hmga2, JunB und Otx1 resultierte in einer bis zu 62 % Reversion dessen Expression auf das Niveau von Rose 199 Zellen (Microarray-Daten, siehe Anhang). Fos11, Hmga2, JunB und Otx1 aktivieren somit Dusp 5, was sich negativ auf den Aktivierungsstatus von pErk auswirkt. Durch Einfluss auf pErk beeinflussen diese Faktoren auch den Aktivierungsstatus von pAkt, da pErk die Dephosphorylierung und Inaktivierung von pAkt bewirkt (Pervin, et al., 2003).



Netzwerkes gefunden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte unter anderem daran liegen, dass lückenhafte Informationen über Rattesequenzen existieren, da die meisten Untersuchungen in den humanen Systemen durchgeführt werden. Des Weiteren ist für architektonische Transkriptionsfaktoren, wie dem Hmga2, eine Analyse nicht möglich, da diese Transkriptionsfaktoren hauptsächlich zu AT-reichen Abschnitten der DNA binden und somit fast keine spezifischen Bindungssequenzen besitzen (Reeves and Beckerbauer, 2001). Es ist daher denkbar, dass die hier untersuchten Transkriptionsfaktoren sich gegenseitig durch Promotorbindung beeinflussen, was zum Beispiel mittels „Chip on Chip“-Analysen untersucht werden kann.

Für mögliche direkte Regulationen durch Protein-Protein-Interaktionen spricht, dass die untersuchten Transkriptionsfaktoren Fos1, JunB, Gfi1, Hmga2 und RelA in großen Proteinkomplexen wirken können (Edelstein, et al., 2003; Mantovani, et al., 1998; McGhee, et al., 2003). Proteininteraktionen von NF-kappaB mit Ap-1, Hmga2 und c-Jun sind zum Beispiel bei der Bildung von Enhanceosom-ähnlichen Komplexen in Promotorregionen des anti-apoptotischen Bfl/A1 Gens bekannt. Diese führen zu seiner Aktivierung (Edelstein, et al., 2003). Für die Expression von Fos1 ist ebenfalls ein Proteinkomplex notwendig (Adiseshaiah, et al., 2005). Diese Annahme macht deutlich, dass weitere in Frage kommende Transkriptionsfaktoren untersucht werden müssen, um das gesamte Netzwerk aufzuklären. Die weiteren differenziell exprimierten Transkriptionsfaktoren aus Tabelle 1 sind mögliche Kandidaten für die funktionelle Beteiligung an solchen Netzwerken.

3.3 Rose A2/5 Zellen haben einen stammzellähnlichen Charakter

Die Suche nach Faktoren, die den Tumorzellen Eigenschaften, wie Selbsterneuerung und Pluripotenz verleihen, zeigte eine große Übereinstimmung mit regulatorischen Prozessen in Stammzellen. Die neuen Theorien zur Tumorentstehung gehen davon aus, dass sich Tumorzellen aus sogenannten langlebigen tumor-initiierenden Zellen (Stammzellen) entwickeln (Reya, et al., 2001). Der Verbleib der Stammzellen in der G0-Zellzyklusphase spielt eine wichtige Rolle bei Versagen der üblichen Tumorthérapien. Bis jetzt richten sich fast alle Therapien gegen schnell wachsende Tumorzellen, wodurch die langlebigen Tumorstammzellen nicht erfasst werden. Daher werden die am Ruhezustand beteiligten Faktoren als potenzielle therapeutische Zielgene diskutiert (Liu, et al., 2009).

Da das onkogene KRAS auch in hämatopoetischen Stammzellen Leukämie initiieren kann (Sabnis, et al., 2009), ist die Charakterisierung von Faktoren, die an der KRAS-vermittelten Transformation beteiligt sind, von größter Bedeutung für neue Therapieansätze. Interessanterweise sind die Transkriptionsfaktoren Gfi1, Hmga2 und Klf6 in embryonalen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Während Gfi1 als Zellzyklusregulator wirkt und für die Selbsterneuerung der Stammzellen essenziell ist, regulieren Hmga2 und Klf6 die Proliferation, Differenzierung und die EMT-Prozesse (Li, et al., 2007; Li, et al., 2006; Liu, et al., 2009; Matsumoto, et al., 2006; Zeng, et al., 2004). In Rose A2/5 Zellen wirkte Gfi1 ebenfalls als Zellzyklusregulator, während Hmga2 und Klf6 spezifisch die Ankerabhängigkeit der Rose A2/5 Zellen beeinflussten (Abb. 15, Abb. 18). Die Funktionen von Gfi1, Hmga2 und Klf6 waren somit in Rose A2/5 Zellen und Stammzellen ähnlich. Daher ist es denkbar, dass Gfi1 ebenfalls zur Selbsterneuerung der Rose A2/5 Zellen beiträgt. Als Startpunkt für weiterführende Analysen von Gfi1 und seinen Zielgenen in Rose A2/5 Zellen eignen sich Microarray-Daten, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden.

3.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich funktionelle Studien und mathematische Modelle auf der Basis experimenteller Daten ergänzen. Modelle die RNA- und Proteindaten beinhalten geben im Vergleich zu Modellen, die nur auf RNA-Datensätzen basieren, ein vollständigeres Bild der zellulären Vorgänge ab (Abb. 23, Abb. 31). Für eine genauere Analyse der regulatorischen Interaktionen innerhalb des transkriptionellen Netzwerkes, müssten alle 51 überexprimierten Transkriptionsfaktoren im Rose A2/5 Zellsystem untersucht werden (Tab. 1). Dafür würde sich eine Durchführung von systematischen Knock-downs in Kombination mit Promotorbindungsvorhersagen eignen. Das Erfassen aller Interaktionen in einem transkriptionellen Netzwerk kombiniert mit funktionellen Studien, die diese Interaktionen in einen zellulären Kontext bringen, würde das Verständnis der Vorgänge in der Zelle enorm beschleunigen. Somit schafft diese Arbeit die Motivation das reduzierte, transkriptionelle Netzwerk zu erweitern.

Die Suche nach neuen Therapieansätzen konzentriert sich auf Vorgänge und Komponenten, die in Invasionsprozessen, Metastasenbildung und EMT involviert sind (Hotz, et al., 2007; Mani, et al., 2008; Yang, et al., 2004). Im Rahmen dieser

Arbeit wurde unter Verwendung eines „Zwei-Tumorstufen“-Zellkulturmodells, das aus immortalisierten und transformierten Zellen besteht, eine Möglichkeit für die gezielte vor-Selektion der an diesen Prozessen beteiligten Komponenten gezeigt. Proliferationsanalysen eigneten sich zur Unterscheidung der Transkriptionsfaktoren, die für die uneingeschränkte (2D) Proliferation wichtig sind und denjenigen, die spezifisch die Ankerunabhängigkeit beeinflussen. Da in jedem Tumortyp andere Signaltransduktionswege als erstes aktiviert werden, werden dadurch auch andere Transkriptionsfaktoren aktiv. Für jeden Tumortyp wäre daher eine individuelle Klassifizierung der Transkriptionsfaktoren sinnvoll. Zusätzliche funktionelle Untersuchungen, wie zum Beispiel Migrationsanalysen, könnten bei der Erstellung weiterer Kategorien oder bei der Bestätigung der zwei Gruppierungen helfen.

Die metastasierenden Tumore weisen einen hohen Grad an Resistenzen gegenüber existierenden Therapien auf. Diese Therapien richten sich bisher überwiegend gegen einzelne intrazelluläre Signalmoleküle und Rezeptoren (Breccia, et al., 2009; Kastiris, et al., 2009; Lu, et al., 2009; You, et al., 2009). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf die Existenz einer kompensatorischen Regulation hin. Diese bewirkt eine gegenseitige Regulation zwischen den transkriptionellen Netzwerken und der zytoplasmatischen Signaltransduktion, die deren gegenseitigen Abhängigkeit bedingt (Abb. 31, Abb. 28, Abb. 30). Trotz Perturbation (hier experimentell durch siRNA) wird dadurch das effiziente Überleben der transformierten Zellen sichergestellt. Möglicherweise behindern solche Regulationskreise in der klinischen Situation die effektive Wirkung zielgerichteter Therapien, was in weiteren Experimenten *in vitro* und *in vivo* untersucht werden müsste.

4 Methoden

4.1 Zellkulturmethoden

4.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der Rose 199 und Rose A2/5 Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (75 cm²) mit D10-Medium in einem Zellinkubator (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit). Zu Rose A2/5 Zellen wurde zusätzlich G418 (400 µg/µl) zugegeben. Für Passagieren der Zellen wurden die mit PBS gewaschenen Zellen bis zum mikroskopisch-sichtbaren Ablösen mit Trypsin-EDTA trypsinisiert. Nach Zugabe von 8 ml D10-Medium erfolgte ein Zentrifugationsschritt in der Zellkulturzentrifuge (5 min, 700 rpm). Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem D10-Medium resuspendiert und in neuen Zellkulturflaschen (75 cm²) im Zellinkubator weiterkultiviert.

4.1.1.1 Auftauen von Zellen

Das Auftauen der eingefrorenen Zellen erfolgte im Wasserbad unter Schwenken (37 °C, 1-2 min). Nach Überführung in ein 15 ml-Röhrchen wurde tropfenweise und unter leichtem Schütteln D10-Medium (10 ml) dazugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt (Zellkulturzentrifuge, 5 min, 700 rpm) wurde das Zellpellet in neuem D10-Medium resuspendiert. Die Weiterkultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen (75 cm²) im Zellinkubator.

4.1.1.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden bei einer 70%-igen Konfluenz passagiert und in 3 ml D10-Medium resuspendiert. Zum Einfrieren wurden je 900 µl Zellsuspension in Kryoröhrchen mit 100 µl DMSO versetzt und durch leichtes Schütteln vermischt. Die Abkühlung auf -80 °C (1 °C/h) erfolgte in einem Isopropanol-gefüllten Einfrierbehälter und die Langzeitlagerung im Stickstofftank.

4.1.2 Lebendzellzahlbestimmung mit Trypanblau

Trypanblau hat die Eigenschaft die Membran von toten Zellen zu passieren. Dadurch

färbt sich deren Zytoplasma im Gegensatz zu lebenden Zellen blau. Auf diese Weise lassen sich lebende von toten, aber noch intakt erscheinenden Zellen voneinander unterscheiden.

Die trypsinierten Zellen wurden in D10-Medium resuspendiert und 50 µl davon 1:1 mit Trypanblau gemischt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur (RT, 10 min) erfolgte die Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert multipliziert mit 10^4 ergab die Anzahl der Zellen pro ml.

4.1.3 Analyse der Morphologie der Zellen

Die Morphologie der Zellen ist ein *in vitro* Korrelat zu deren Malignität. Die Analyse der Morphologie erfolgte im Phasenkontrastmikroskop bei einer 100fachen Vergrößerung. Zur Darstellung im Ergebnisteil wurden repräsentative Ausschnitte aus den Originalbildern erstellt, die einer 457fachen Vergrößerung entsprachen.

4.1.4 Transienter Knock-down

Die Untersuchungen der Funktion eines Genprodukts *in vitro* erfolgten mittels siRNA-Interferenz. Bei dieser Methode werden kurze RNA-Duplexe (siRNA) verwendet, die komplementär zu der Ziel-mRNA sind. Nach Anlagerung an die zugehörige mRNA entsteht eine doppelsträngige RNA, die anschließend enzymatisch zerschnitten wird. Dies bewirkt eine drastische Abnahme der Ziel-mRNA und des zugehörigen Proteins (Hammond, 2005; Moffat and Sabatini, 2006; Ngo, et al., 1998).

Die Anzahl unspezifischer Effekte, der so genannten Off-target-Effekte, nimmt mit einer steigenden Konzentration von siRNA-Duplexen, die für ein Experiment benötigt wird, drastisch zu (Tschuch, et al., 2008). Eigene Vorexperimente ergaben eine optimale Endkonzentration von 100 nM für fertig synthetisierte Duplexe und von 1 nM für die selbst hergestellten Duplexe. Die Produktion von selbst hergestellten siRNA-Duplexen erfolgte mit dem „Silencer®siRNA Construction Kit“ nach Herstellerangaben.

Die Transfektionen mit siRNA-Duplexen erfolgten jeweils 24 h und 48 h nach dem Ausplattieren der Rose A2/5 Zellen (6-Well-Platte: 4×10^4 /Vertiefung). Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 800 µl des Transfektionsmediums, OptiMEM, versetzt. In getrennten Ansätzen wurden je 3 µl Transfektionsreagenz,

Oligofectamine, mit 12 µl OptiMEM (Ansatz 1) sowie 180 µl bzw. 183 µl OptiMEM mit der entsprechenden Menge an siRNA-Duplexen (Ansatz 2) vorbereitet. Nach einer Inkubation (RT, 5 min) wurden die Ansätze zusammengefügt und vorsichtig gemischt. Nach einem Inkubationsschritt (RT, 20 min) erfolgte die gleichmäßige Verteilung auf die vorbereiteten Zellen. Es folgte ein Inkubationsschritt im Zellinkubator (4 h) nach dem die zelluläre Aufnahme der siRNA-Duplexe durch Zugabe von 500 µl OptiMEM mit 30%-igem FCS gestoppt wurde.

4.1.5 Analysen mit Inhibitoren

Für Analysen funktioneller Effekte konstitutiv aktiver Signalkaskaden *in vitro* eignen sich Experimente mit Inhibitoren, die gegen eine der Komponenten des zytoplasmatischen Signaltransduktionsweges gerichtet sind und eine Unterbrechung der Signalweiterleitung durch deren funktionelle Blockade bewirken. Dies erlaubt eine Zuordnung bestimmter zellulärer Prozesse, wie der Proliferation, Apoptose und Transformation zu den einzelnen Signaltransduktionswegen, sowie eine nähere Charakterisierung und Untersuchung der Zielgene.

Die Stammlösung des Mek1/2-spezifischen U0126-Inhibitors wurde auf 20 mM und die des PI-3-K-spezifischen LY294002-Inhibitors auf 50 mM mit DMSO eingestellt. Beide Inhibitoren wurden in einer Endkonzentration von 10 µM für die Experimente verwendet. Zu Kontrollzellen wurden die gleichen Mengen (in µl) an DMSO dazugegeben.

4.1.6 Proliferationstest

4.1.6.1 Herstellung PolyHEMA beschichteter 96-Well-Platten

Tumorzellen mit Invasionspotential können auch ohne Verankerung an einer Oberfläche proliferieren. Die Messung der ankerunabhängigen (3D) Proliferation von Tumorzellen *in vitro* ist daher ein Korrelat für deren Malignität. Die Messung der ankerunabhängigen (3D) Proliferation erfolgte in PolyHEMA-beschichteten 96-Well-Platten, da PolyHEMA die Verankerung von Zellen verhindert. Hierzu wurde PolyHEMA (5 mg/ml) in Ethanol unter Rühren gelöst und je 100 µl pro Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert. Das Trocknen der PolyHEMA-Platten erfolgte im

Inkubatorschrank (37 °C, 3 Tage). Anschließend wurde die Beschichtung mikroskopisch auf deren Gleichmäßigkeit kontrolliert.

4.1.6.2 Proliferationsmessung im XTT- und alamarBlue-Test

Beide Tests beruhen auf dem Prinzip der Reduktion eines Tetrazolium-Salzes zum Formazan durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase. Zwischen der oxidierten und der reduzierten Form der Substanz entstehen Änderungen im Absorptionsmaximum, die photometrisch erfasst werden können (XTT-Test: Wellenlänge: 490 nm, Referenzwellenlänge: 690 nm, alamarBlue-Test: Wellenlängen bei 570 nm und 600 nm). Für die Tests wurden pro 96-Well je 5×10^2 Zellen in 100 µl Endvolumen ausplattiert.

Für die XTT-Messung wurden pro Messtag parallel eine 96-Well-Platte mit PolyHEMA-Beschichtung für ankerunabhängige (3D) Proliferation und eine ohne Beschichtung für ankerabhängige (2D) Proliferation verwendet. Die Zugabe der XTT-Substanz erfolgte 24 h nach dem Ausplattieren der Zellen nach Herstellerangaben. Die Proliferationsmessungen wurden nach einem Inkubationsschritt im Zellinkubator (4 h) im ELISA-Reader durchgeführt. Die gemessenen Absorptionswerte entsprechen direkt den Werten für die Proliferation. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Ergebnisse abzüglich des Mediumwertes prozentual auf die der Sc-Kontrolle bezogen.

Die Zugabe der alamarBlue-Substanz erfolgte einmalig 4 h nach dem Ausplattieren der Zellen nach Herstellerangaben. Die kontinuierliche Proliferationsmessung erfolgte jeweils 24 h bis 96 h nach der letzten Transfektion. Die kontinuierliche Messung führt zu einer Akkumulation der bereits umgesetzten Substanz, daher können sich die gemessenen Werte von der Zellzahl unterscheiden. Die Berechnung der prozentualen Reduktion der alamarBlue-Substanz erfolgte nach der vom Hersteller mitgelieferten Formel abzüglich des Mediumwertes.

Formel zur Bestimmung der prozentualen alamarBlue-Reduktion (Proliferation):

$$\% \text{ Reduktion} = \frac{(\lambda_{\text{ox}}\lambda_2) (A\lambda_1) - (\lambda_{\text{ox}}\lambda_1) (A\lambda_2)}{(\lambda_{\text{red}}\lambda_1) (A'\lambda_2) - (\lambda_{\text{red}}\lambda_2) (A'\lambda_1)} \times 100$$

$(\lambda_{\text{red}}\lambda_1) = 155,677$ (Molarer Extinktionskoeffizient der reduzierten alamarBlue-Form bei 570 nm).

$(\lambda_{\text{red}}\lambda_2) = 14,652$ (Molarer Extinktionskoeffizient der reduzierten alamarBlue-Form bei 600 nm).
 $(\lambda_{\text{ox}}\lambda_1) = 80,586$ (Molarer Extinktionskoeffizient der oxidierten alamarBlue-Form bei 570 nm).
 $(\lambda_{\text{ox}}\lambda_2) = 117,216$ (Molarer Extinktionskoeffizient der oxidierten alamarBlue-Form bei 600 nm).
 $(A\lambda_1)$ = Absorption der Probe bei 570 nm.
 $(A\lambda_2)$ = Absorption der Probe bei 600 nm.
 $(A'\lambda_1)$ = Absorption des Mediumwertes bei 570 nm.
 $(A'\lambda_2)$ = Absorption des Mediumwertes bei 600 nm.

4.1.7 Zellzyklusanalysen

Für die Zellzyklusanalysen wurde die DNA der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid gefärbt. Propidiumjodid ist ein DNA-interkalierendes Molekül, das stöchiometrisch an die doppelsträngige DNA bindet. Die gefärbten Zellen können entsprechend den detektierten Fluoreszenzsignalen den Zellzyklusphasen zugeordnet werden. Dabei können folgende Zellzyklusphasen voneinander unterschieden werden: G0/G1, diploide Zellen mit einem Chromosomensatz von 1n, G2, tetraploide Zellen mit einem Chromosomensatz von 2n und S, zwischen di- und tetraploiden Zellen mit einem Chromosomensatz zwischen 1n und 2n. Im SubG0/G1 Peak stellen sich die Zellen der mittleren bis späten Apoptosephase dar, die aufgrund des geringeren DNA-Gehaltes noch vor den diploiden Zellen erscheinen.

Für die Zellzyklusanalysen wurde das Zellpellet nach dem passagieren der Zellen in 1 ml 70%-igen Ethanol fixiert (4 °C, mindestens 20 min). Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 1000 xg) wurden die Zellpellets in 500 µl Verdünnungspuffer resuspendiert und mit RNase behandelt (10 mg/ml, 37 °C, 30 min). Nach einer erneuten Zentrifugation (5 min, 1000 xg) erfolgte das Färben der Zellen im Dunkeln mit Propidiumjodid (20 µg/ml) in 500 µl Verdünnungspuffer (20 min). Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Die Erstellung der Histogramme und die Berechnung der prozentualen Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen erfolgten mittels der Programme Cylchred und WinMDI2.8.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurden die mit PBS gewaschenen Zellen durch Zugabe von 1 ml Trizol pro eine 10 cm-Petrischale homogenisiert. Nach einem Inkubationsschritt (RT, 5 min) erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform zu dem Trizol/Zelllysate. Nach

gutem Durchmischen folgte ein Inkubationsschritt (RT, 4 min) sowie ein Zentrifugationsschritt (4 °C, 15 min, 14.000 xg). Die wässrige Oberphase wurde in neuen Reaktionsgefäßen mit 500 µl Isopropanol vermischt bis sich keine Schlieren mehr bildeten und inkubiert (RT, 20 min). Nach einem Zentrifugationsschritt (4 °C, 10 min, 14.000 xg) wurde der Überstand verworfen und das Pellet drei Mal mit 1 ml 75%-igen Ethanol gewaschen (4 °C, 5 min, 14.000 xg). Die luftgetrocknete RNA wurde in 50 µl nukleasefreien Wasser aufgenommen und nach einer Inkubation (55 °C, 10 min) bei –80 °C gelagert.

Um eine möglichst hohe Qualität der RNA zu gewährleisten, wurde zusätzlich eine Aufreinigung über RNeasy-Säulen nach Herstellerangaben durchgeführt. In diesem Schritt erfolgte auch ein DNase-Verdau, um Kontaminationen mit DNA auszuschließen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei –80 °C.

4.2.1.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte im Nanophotometer durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) und 280 nm (OD_{280}). Eine $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 27-35 µg/ml einzelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Der Reinheitsgrad einer Lösung kann durch den Quotienten OD_{260}/OD_{280} ermittelt werden und sollte bei aufgereinigter RNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.2.2 RT-PCR

Die RT-PCR dient dem qualitativen Nachweis einer spezifischen mRNA-Menge in zellulären RNA-Gesamtextrakten. Dabei erfolgt zuerst eine Reverse Transkription zum Umschreiben der mRNA-Sequenz in die komplementäre cDNA-Sequenz und anschließend eine Amplifikation zur Vervielfältigung der cDNA-Menge. Die Vorbereitung der Ansätze (A und B) für die RT-PCR erfolgte unter Verwendung des Kits „C. therm. Polymerase One-Step RT-PCR System“ nach Herstellerangaben, mit der Reversen Transkription und der anschließenden Amplifikation in einem Schritt.

Ansatz A:

Komponente:	Volumen:
nucleasefreies H ₂ O	7,85 µl
25 mM dNTP-Mix	0,4 µl
DTT	1,25 µl
DMSO	1,25 µl
5'-Primer	0,375 µl
3'-Primer	0,375 µl
RNA (100 ng/µl)	1 µl

Ansatz B:

Komponente:	Volumen:
nucleasefreies H ₂ O	6,5 µl
5 x RT-Puffer	5 µl
Polymerase-Mix	1 µl

Nach Vereinigung der beiden Ansätze wurde die RT-PCR nach folgender Einstellung im Thermocycler durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Temperatur und Dauer
1 x	60 °C für 40 min
1 x	94 °C für 2 min
9 x	94 °C für 30 sek 55-60 °C für 30 sek 72 °C für 50 sek
19-30 x	94 °C für 30 sek 55-60 °C für 30 sek 72 °C für 50 sek

Die im 1,5%-igem Agarosegel aufgetrennten Proben wurden anschließend im UV-Licht analysiert.

4.2.3 Herstellung von RASTA-2 Microarrays

Die Zuordnung der Zielgene von KRAS und der KRAS-abhängig überexprimierten Transkriptionsfaktoren erfolgte mittels RNA-Expressionsprofilen, die mit „customized“-Microarray “Ras signaling target array“-2 (RASTA-2) erstellt wurden.

Dafür wurde der RASTA-Microarray (Tchernitsa, et al., 2004) um Sequenzen für die ausgewählten Transkriptionsfaktoren erweitert. Als Proben für die korrespondierenden Gene wurden unmodifizierte 70mer-Oligonukleotide (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg) ausgewählt. Für die Auswahl der Oligonukleotide wurden die gleichen Parameter wie bei dem ursprünglichen RASTA-Array angewandt: Schmelztemperatur zwischen 74-76 °C, GC-Gehalt zwischen 45-55 %, keine ausgeprägten sekundärstrukturen und Nähe zu dem 3'-Ende der Kodierungssequenz. Die RASTA-2 umfassten 329 Gene.

Die Anfertigung der Microarrays erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Oleg Tchernitsa aus der Arbeitsgruppe Molekulare Tumorpathologie/Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité.

4.2.3.1 Poly-L-Lysin-Beschichtung

Für die Herstellung der Microarray wurden Superfrost Objektträger mit Poly-L-Lysin beschichtet. Die Reinigung der Objektträger erfolgte mit NaOH in 95%-igem Ethanol (200 g/800 ml) unter Rühren (RT, 5-6 h). Nach gründlichem Spülen mit bi-distiliertem Wasser wurden die luftgetrockneten Objektträger mit Poly-L-Lysin-Lösung unter Schütteln (30 min) beschichtet. Einer anschließenden gründlichen Reinigung mit bi-distiliertem Wasser folgten ein Zentrifugationsschritt zum Entfernen der restlichen Flüssigkeit und das Trocknen der beschichteten Objektträger im Inkubator (45 °C, 2 h).

4.2.3.2 Spotten der Chips und Blocken nach Bernsteinanhydrid-Methode

Die korrespondierenden 70mer-Oligonukleotide für die 329 Gene wurden auf eine Konzentration von 20 µM in 3 x SSC mit 0,01 % SDS verdünnt und jeweils in einer dreifachen Ausführung auf die mit Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger gespottet. Nach dem Spotten wurden die Objektträger mit der Oberfläche über heißem Wasserdampf erhitzt (60 °C, 2 x 5 sek) und mit der Unterseite auf einer heißen Platte getrocknet (90 °C, 10 sek). Das Verlinken erfolgte unter UV-Licht bei 60 mJ. Die gespotteten Objektträger wurden unter Rühren in Blockierungslösung geblockt (20 min). Es folgten drei Waschschrte mit bi-distiliertem Wasser (95 °C, 2 min), ein Zentrifugationsschritt zum Trocknen und ein Inkubationsschritt im Hybridisierungssofen (37 °C, 30 min).

4.2.3.3 cDNA-Hybridisierung und Scannen der Microarrays

Die Hybridisierungsschritte erfolgten unter Verwendung des „3DNA Array 900 MP X Kit“ nach Herstellerangaben. Für den RNA-RT-Primer-Mix wurden jeweils 4 µg Gesamt-RNA und 8 µl Random-Primer in einem Endvolumen von 11 µl eingesetzt. Im nächsten Schritt wurde die extrahierte Gesamt-RNA nach Umwandlung in cDNA mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Grün: Cy3 und Rot: Cy5) markiert. Für die Herstellung der Expressionsprofile wurde die Gesamt-RNA aus einem Knock-down-Experiment zusammen mit der Gesamt-RNA der Sc-Kontrollen in cDNA umgewandelt, unterschiedlich markiert und zusammen auf einen Microarray hybridisiert. Die Probe der unbehandelten Rose A2/5 Zellen befand sich zusammen mit der der unbehandelten Rose 199 Zellen auf einem Array. Die Microarrays wurden anschließend durch Zentrifugation getrocknet. Für jedes Probenpaar wurde ein zusätzlicher Chip mit umgekehrt markierten RNA-Proben angefertigt.

4.2.3.4 Auswertung der Microarrays

Das Scannen der Microarrays erfolgte mittels des Agilent-Scanners bei zwei Wellenlängen (Cy3 bei 570 nm und Cy5 bei 660 nm). Die Analyse der gescannten Microarray-Bilder erfolgte mittels des ImaGene-Programms. Nach einer globalen Normalisierung jedes Microarrays gegen die Intensitäten von „Housekeeping“-Genen wurden die signifikanten Fluoreszenzänderungen mittels des ImaGene-Programms und die statistische Signifikanz mittels dem „Statistical analysis of Microarrays“ (SAM) Algorithmus ermittelt (Tusher, et al., 2001). Somit wurde als Endwert für ein Gen der Mittelwert aus 6 Positionen, die bei Anfertigung von jeweils zwei Chips mit dreifachen Replika entstanden, angegeben.

4.2.4 Proteinisolierung

4.2.4.1 Isolierung von Gesamtproteinen

Während der Isolierung erfolgten alle Schritte auf Eis, um die Degradation der Proteine zu vermeiden. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS und Zugabe von 500 µl Lysepuffer erfolgte ein Inkubationsschritt unter leichtem Schütteln (30 min). Nach dem Abschaben der homogenisierten Zellen mit einem

Zellkulturschaber, wurde das Lysat mit einem Volumen von 2 x SDS-Probenpuffer vermischt und im Heizblock gekocht (95 °C, 10 min). Nach einer Zentrifugation (4 °C, 10 min, 14.000 xg) wurden je 200 µl des Überstandes aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.2.4.2 Isolierung von Kernproteinen

Die aktiven Transkriptionsfaktoren weisen überwiegend eine Kernlokalisation auf. In Kernextrakten ist somit deren Proteinexpression effizienter nachzuweisen. Die Isolierung der Kernextrakte wurde auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 3 ml Hypolysepuffer (10 cm-Kulturschale) und einem Inkubationsschritt (5 min) erfolgte das Abschaben der Zelllysate mit einem Zellkulturschaber und das anschließende Umfüllen in vorgefühlte Homogenisatoren. Nach dreimaligen Mixen mit einem vorgefühlten Pestill erfolgte die mikroskopische Kontrolle der Kernintaktheit. Nach der Zentrifugation der Proben (4 °C, 10 min, 3000 rpm, *Avanti J-25*, Rotor: JA-20) wurde das Pellet in PBS resuspendiert und in Aliquoten bei -20 °C gelagert.

Das Vermischen der Proben mit einem Volumen des 2 x SDS-Probenpuffers und das Aufkochen im Heizblock (95 °C, 10 min) erfolgte unmittelbar vor der Verwendung der Proteine für Western Blot-Analysen.

4.2.4.3 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Für Konzentrationsbestimmung der Gesamtproteine wurde die Amidoschwarzmethode verwendet (Schaffner and Weissmann, 1973). Zunächst erfolgte die Erstellung einer BSA-Eichkurve (0.5-10 mg/ml). Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurden je 1 µl BSA- bzw. Proteinprobe auf eine Nitrozellulosemembran aufpipetiert und die Membran anschließend mit Amidoschwarz gefärbt (RT, 1 min). Das Entfärben der Membran erfolgte in Entfärber-Lösung unter Schütteln (10 min). Die noch gefärbten Proteinproben wurden mit Skalpell ausgeschnitten und in Elutions-Lösung unter Schütteln aufgelöst (RT, 800 µl, 30 min). Die photometrische Messung erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 630 nm und die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Kernextrakten im Nanophotometer unter Verwendung von PBS als Referenzwert.

4.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden nach Größe mittels Elektrophorese in den zuvor gegossenen Polyacrylamid-Gelen (4%-iges Sammelgel, 12%-iges Trenngel) in Laufpuffer aufgetrennt. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten mit Abstandshaltern gegossen. Nach dem Gießen und der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen. Die Geltaschen wurden durch Einfügen eines Kammes in das nicht-polymerisierte Sammelgel geformt. Zur Ermittlung der Proteingröße wurden 5 µl des Proteinmarkers mit aufgetrennt. Es wurden jeweils 40 µg der Gesamtextrakte und 30-60 µg der Kernextrakte pro Geltasche eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bis zur Hälfte des Trenngels bei 60 V, danach wurde die Spannung auf 110 V erhöht.

4.2.6 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel verworfen und das Trenngel durch die Inkubation im Transferpuffer (15 min) für den Semi-dry Blot vorbereitet. Gleichzeitig erfolgte die Inkubation einer, auf die Größe des Gels zugeschnittener, Nitrozellulosemembran (10 min) und sechs Whatmann-Papieren im Transferpuffer. Der Transfer wurde in einer Transferkammer durchgeführt, wobei auf drei Whatman-Papieren das Gel, die Nitrozellulosemembran und abschließend drei weitere Whatman-Papiere gelegt wurden. Für zwei Gele wurde der Transfer bei 200 mA durchgeführt. Die Dauer des Transfers hing von der Größe des nachzuweisenden Proteins ab (30 min für Hmga2, 60 min für RelA, alle übrigen Proteine 40 min). Nach dem Transfer wurde die Membran in 10%-iger Magermilch in TBST auf einem vertikalen Schüttler geblockt (RT, 1 h). Danach wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen (RT, 5 min) und mit entsprechenden primären Antikörper inkubiert (RT, 1 h). Nach der Inkubation erfolgten drei Waschschrte der Membran mit TBST (RT, 5 min) und eine Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper auf einem horizontalen Schüttler (4 °C, ÜN). Nach der Inkubationszeit wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Chemolumineszenz auf Amersham Hyperfilmen ECL nach Herstellerangaben. Die entwickelten und fixierten Filme wurden gut mit Wasser abgespült und luftgetrocknet.

4.2.6.1 Strippen von Membranen

Im Falle der Detektion mehrerer Proteine auf einer Membran, wurde die Membran zwischen den einzelnen Detektionen mit dem „Western Blot Recycling Kit“ nach Herstellerangaben gestrippt. Die Ladekontrolle wurde als letztes auf der Membran detektiert. In solchen Fällen wurde im Ergebnissteil die Ladekontrolle mehrfach gezeigt. Da die Proteine unterschiedliche Größe hatten, konnte die Effizienz des Strippons im Rahmen der nachfolgenden Detektion überprüft werden.

4.3 Berechnungen und statistische Analysen

4.3.1 Berechnung der statistischer Signifikanz

Die statistische Berechnung der signifikanten Unterschiede in den Proliferationstests erfolgte mithilfe des Programms GraphPadPrism 5.01 unter Verwendung des allgemeinen „1way ANOVA“ Tests, einer Kombination aus dem F-Test und einem modifizierten t-Test, und des Post Hoc Tests „Tukey“.

4.3.2 Darstellung der Expressionsprofile der Microarray-Analysen

Für die Darstellung der Expressionsprofile wurden die Werte der Gene, die nach dem Knock-down der Transkriptionsfaktoren differenziell exprimiert wurden ($\pm 0,7$, log2) zu den Werten der KRAS-Expression (Expressionsprofil von Rose 199/Rose A2/5 Zellen) hinzuaddiert (siehe Beispiele).

Beispiel 1: Überexpression in Rose A2/5 Zellen im Vergleich zu Rose 199 Zellen (**KRAS). Reversion nach Hmga2 Knock-down mit zwei unabhängigen siRNA-Duplexen in Rose A2/5 Zellen im Vergleich zu Sc (*Hmga2 (1), *Hmga2 (2)). Resultierende Expressionsmenge in Rose A2/5 Zellen (KRAS + Hmga2). (1); (2): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Genname	***KRAS	*Hmga2 (1)	*Hmga2 (2)	KRAS+*Hmga2 (1)	KRAS+*Hmga2 (2)
Akr1d1	1,63	-0,79	-1,10	0,84	0,53

Beispiel 2: Herunterregulation in KRAS-transfizierten Rose A2/5 im Vergleich zu nicht-transfizierten Rose 199 Zellen (***KRAS). Eine noch stärkere Herunterregulation nach Hmga2 Knock-down mit zwei unabhängigen siRNA-Duplexen in Rose A2/5 Zellen im Vergleich zu Sc (*Hmga2 (1), *Hmga2 (2)). Resultierende Expressionsmenge in Rose A2/5 Zellen (KRAS + Hmga2). (1); (2): Zwei unabhängige siRNA-Duplexe für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor.

Genname	***KRAS	*Hmga2 (1)	*Hmga2 (2)	KRAS+*Hmga2 (1)	KRAS+*Hmga2 (2)
Mmp2	-0,84	-1,17	-1,09	-2,01	-1,93

4.3.3 Berechnung der prozentualen Reversion aus Microarray-Daten

Für die Berechnung der prozentualen Reversion wurden die Werte aus den Microarray-Analysen, die nach dem Knock-down der Transkriptionsfaktoren differenziell exprimiert waren ($\pm 0,7$, log2) prozentual auf die Werte von KRAS (Expressionsprofil von Rose 199/Rose A2/5 Zellen) berechnet.

4.3.4 Hierarchische Clusteranalyse

Die hierarchische Clusteranalyse erfolgte mit dem Computer-Programm „Hierarchical clustering explorer“. Hierzu wurden die vollständigen Microarray-Daten in eine Textdatei umgewandelt und die Analyse mit folgenden Parametern durchgeführt: „Row- by-row“, Normalisierung, „Average linkage“.

5 Materialien

5.1 Laborgeräte und Materialien

10 cm Petrischalen	BD Falcon, Heidelberg
15 ml; 50 ml Röhrchen	BD Falcon, Heidelberg
6-Well-Platten	Sarsted, Nümbrecht
96-Well-Platten	BD Falcon, Heidelberg
Durchflussszytometer, FACS Calibur	BD, Heidelberg
Elektrophoresekammer und Zubehör	Biorad, München
ELISA-Reader	Biorad, München
Einfrierbehälter	Nalgene, Denemark
Gerät zum Spotten von Microarrays	BioRobotics, USA
Homogenisator	Kontes Glas, USA

Hybridisierungssoffen
 Krosslinker, UVC-500
 Kryoröhrchen
 Kulturflaschen (Zellkultur)
 Magnetrührer
 Mikro-Reaktionsgefäße
 Mikroskop + Kamera (Zellkultur)
 Mikrowelle
 Nanophotometer
 Nitrozellulosemembran
 Objektträger (Microarray)
 Phasenkontrastmikroskop und Kamera
 PH-Meter
 Röntgenfilme, Amersham Hyperfilm ECL
 Scanner, G2562AA
 Spannungsgerät
 Thermocycler (Genius, Progene)
 Thermomixer
 Transferkammer
 UV-Gerät und Kamera
 vertikaler Schüttler
 Vortexer
 Waage
 Wasserbad, 1004
 Zellinkubator
 Zellkulturzentrifuge Allegra X15R
 Zentrifuge (Microarray)
 Zentrifuge 5417R
 Zentrifuge Avanti J-25; Rotor: JA-20

Implen, München
 Hoefer, USA
 Sarsted, Nümbrecht
 BD Falcon, Heidelberg
 IKA Werke, Staufen
 Eppendorf, Hamburg
 Leica DMIL, USA
 Samsung, Schwalbach
 Implen, München
 Protran Whatman GmbH, Dassel
 Menzel GmbH, Braunschweig
 Leica DMIL, USA
 Schott GmbH, Mainz
 GE Healthcare, München
 Agilent, USA
 Pharmacia Biotech, Waldkirch
 Biostep, Jahnsdorf
 Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
 PreQLab, Erlangen
 Biostep, Jahnsdorf
 Hoefer, USA
 Heidolph, Schwabach
 Sartorius, Goettingen
 GFL, Burgwedel
 Hera, Blaufelden
 Beckmann, München,
 Telechem, USA
 Eppendorf, Hamburg
 Beckmann, München,

5.2 Chemikalien

Acrylamid
 Agarose
 Amidoschwarz
 APS
 Bernsteinanhydride
 Bromphenolblau
 BSA
 Chloroform
 DEPC
 DMEM
 DMSO
 DOC
 EDTA
 Eisessig
 Ethanol

Roth, Karlsruhe
 Serva, Heidelberg
 Merk, Darmstadt
 Merk, Darmstadt
 Sigma-Aldrich, München
 Sigma-Aldrich, München
 Sigma-Aldrich, München
 Merk, Darmstadt
 Sigma-Aldrich, München
 Invitrogen, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich, München
 Sigma-Aldrich, München
 Merk, Darmstadt
 Merk, Darmstadt
 J.T.Baker, Niederlande

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Film-Entwickler	Kodak, Stuttgart
Film-Fixierer	Kodak, Stuttgart
Formaldehyd	J.T.Baker, Niederlande
fötales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Glycerol	Merk, Darmstadt
Isopropanol	J.T.Baker, Niederlande
KCl	Merk, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merk, Darmstadt
LY294002	Alexis Biochemicals, Lörrach
Magermilch	AppliChem GmbH, Darmstadt
Marker für Agarosegele (SmartLadder SF)	Eurogentec, Ebersberg
Marker für SDS-PAGE (SM0671)	Fermentas, St. Leon-Rot
Methanol	J.T.Baker, Niederlande
MOPS	Merk, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merk, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Merk, Darmstadt
NaOH	Merk, Darmstadt
Natrium-Acetat	Merk, Darmstadt
N-Methyl-Pyrolidione	Sigma-Aldrich, München
Oligofectamine	Invitrogen, Karlsruhe
OptiMEM I	Invitrogen, Karlsruhe
Penicilin/Streptomycin (10000 U/ml)	Biochrom AG, Berlin
PolyHEMA	Sigma-Aldrich, München
Poly-L-Lysine	Sigma-Aldrich, München
Protease-Inhibitoren	Roche, Hannover
SDS	Serva, Heidelberg
Sodiumborat	Sigma-Aldrich, München
β-Mercaptoethanol	Promega, Mannheim
TEMED	Sigma-Aldrich, München
Ter minal Deoxynucleotid Transferase	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-Base	Merk, Darmstadt
Tris-HCl	Merk, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypanblau	Merk, Darmstadt
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Tween20	Serva, Heidelberg
U0126	Promega, Mannheim
Ultraglutamine 1	Lonza, BioWhittaker, Schweiz

5.3 Kommerzielle Kits

3DNA Array 900 MP X Kit	Genisphere, USA
AlamarBlue™ Cell Viability Assay Kit	TREK Diagnostic, England
C. therm. Polymerase One-Step RT-PCR System	Roche, Mannheim
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche, Mannheim

Chemolumineszenz-Detektionskit (Western Blot)	GE Healthcare, München
Protease-Inhibitoren	Roche, Mannheim
Rneasy mini-kit (50)	Qiagen, Hilden
Silencer®siRNA Construction Kit	Ambion, Darmstadt
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Zymed, USA
Western Blot Recycling Kit	Alpha Diagnostic, Herford

5.4 Stammlösungen

Amidoschwarz:	Ansatz:	400 ml
	Amidoschwarz	0,4 g
	Methanol	90 ml
	Eisessig	20 ml
	add. bi-destilliertes Wasser	
Blockierungslösung: (Microarray)	Ansatz:	500 ml
	Bernsteinanhydrid	3,2 g
	n-Methyl-Pyrolidione	200 ml
	1 M Natriumborat	4,45 ml
	add. bi-destilliertes Wasser	
D10-Medium:	DMEM	500 ml
	fötales Kälberserum (FCS)	10 %
	Ultraglutamine 1	2 mM
	Penicillin/Streptomycin	100 Einheiten/ml
0,1 % DEPC-Wasser:	Ansatz:	100 ml
	900 µl DEPC	
	add. bi-destilliertes Wasser	
	autoklavieren	
0,5 M EDTA:	Ansatz:	1000 ml
	EDTA	186,3 g
	NaOH-Plättchen	20 g
	add. bi-destilliertes Wasser	
	pH 8,0	
Elutions-Lösung: (Amidoschwarz)	Ansatz:	500 ml
	Ethanol	250 ml
	0,5 M EDTA	50 µl
	0,5 M NaOH	25 ml
	add. bi-destilliertes Wasser	
Entfärber-Lösung:	Ansatz:	1000 ml

(Amidoschwarz)	Methanol	400 ml
	Eisessig	100 ml
	add. bi-destiliertes Wasser	
Hypolysepuffer: (Isolierung der Kernproteine)	Ansatz:	20 ml
	1 M Tris-HCl, pH 8,0	200 µl
	Cocktail-Tablette in 2 ml bi- destiliertes Wasser	800 µl
	add. bi-destiliertes Wasser	
5 x Laufpuffer: (Western Blot)	Ansatz:	1000 ml
	Tris-Base	15,1 g
	Glycin	72 g
	SDS	5 g
	add. bi-destiliertes Wasser	
	pH 8,3	
Lysepuffer: (Isolierung der Gesamtproteine)	Ansatz: (Lösung 1)	50 ml
	1 M Tris-HCl, pH 8,0	0,06 g
	5 M NaCl	0,438 g
	Triton X-100	0,5 ml
	DOC	0,5 g
	add. bi-destiliertes Wasser	
	Proteinaseinhibitoren frisch dazugeben: (Lösung 2)	
	100 mM PMSF	100 µl
	500 mM NaF	50 µl
	10 mM Leupeptin	50 µl
	100 mM Na-orthovanadate	100 µl
	100 µg/ml Aprotinin	400 µl
	820 µl Lösung 1 + 120 ml Lösung 2	
10 x MOPS:	Ansatz:	2000 ml
	MOPS	83,6 g
	Natrium-Acetat	16,4 g
	0,5 M EDTA	40 ml
	add. bi-destiliertes Wasser	
10 x PBS:	Ansatz:	1000 ml
	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Na ₂ HPO ₄	14,4 g
	KH ₂ PO ₄	2,4 g
	add. bi-destiliertes Wasser	
	pH 7,4	
PolyHEMA-Lösung:	Ansatz:	40 ml

	5 mg/ml PolyHEMA add. 96 % Ethanol RT, 4 h mischen	200 mg
Poly-L-Lysin-Lösung: (Microarray)	Ansatz: Poly-L-Lysin add. bi-destiliertes Wasser	200 ml 20 ml
4 % Sammelgel: (SDS-PAGE)	Ansatz: H ₂ O 0,5 M Tris, pH 6,8 30 % Acrylamid 10 % SDS 10 mM APS TEMED	4 Gele: 6,1 ml 2,5 ml 1,33 ml 100 µl 50 µl 10 µl
2 x SDS-Probenpuffer:	Ansatz: Tris-HCl, pH 6,8 SDS Glycerin β-Mercaptoethanol Bromphenolblau	0,25 M 8 % 40 % 20 % Spatelspitze
5 x TBS:	Ansatz: 1 M Tris-Base pH 8,0 5 M NaCl add. bi-destiliertes Wasser	1000 ml 50 ml 150 ml
TBST:	Ansatz: 1 M Tris-Base pH 8,0 5 M NaCl Tween20 add. bi-destiliertes Wasser	1000 ml 10 ml 30 ml 1 ml
2,5 x Transferpuffer: (Western Blot)	Ansatz: Tris-Base Glycerol 10 % SDS Methanol add. bi-destiliertes Wasser	1000 ml 14,5 g 7,3 g 9,37 ml 500 ml
0,5 M Tris: (Puffer für Sammelgel)	Ansatz: Tris-HCl add. bi-destiliertes Wasser pH 6,8	500 ml 78,7 g
1,5 M Tris:	Ansatz:	500 ml

(Puffer für Trenngel)	Tris-HCl add. bi-distilliertes Wasser pH 8,7	118,7 g
12 % Trenngel: (SDS-PAGE)	Ansatz: H ₂ O 1,5 M Tris, pH 8,6 30 % Acrylamid 10 % SDS 10 mM APS TEMED	2 Gele: 6,7 ml 5 ml 8 ml 200 µl 100 µl 10 µl
Verdünnungspuffer: (FACS)	Ansatz: Triton X-100 BSA add. 1 x PBS	20 ml 0,10 % 0,50 %

5.5 Sequenzen für siRNA-Duplexe

Fosl1 (1) Dharmacon, USA	sense: 5'-GGA CAC AGG UGG UAU CAG CUU-3' antisense: 5'-GCU GGU ACC ACC UGU GUC CUU-3'
Fosl1 (2) Ambion, Darmstadt	sense: 5'-GCU GCU AUU UAU UUU CCU Att-3' antisense: 5'- UAG GAA AAU AAA UAG CAG Ctg-3'
Gfi1 (1) selbst-hergestellt*	sense: 5'-AAC AGA TCT TAC AGT CAA AGC CCT GTC TC-3' antisense: 5'-CAG CTT TGA CTG TAA GAT CTG CCT GTC TC-3'
Gfi1 (2) selbst-hergestellt*	sense: 5'-AAT TTC AAA GGG ATA CTT TCC CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAG GAA AGT ATC CCT TTG AAA CCT GTCTC-3'
Hmga2 (1) selbst-hergestellt*	sense: 5'-AAC TCC CGA GCC GTA GCG GAG CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAC TCC GCT ACG GCT CGG GAG CTT GTC TC-3'
Hmga2 (2) Ambion, Darmstadt	sense: 5'-CCA UUG GAG AAA AAC GGC Ctt-3' antisense: 5'-GGC CGU UUU UCU CCA AUG Gtc-3'
JunB (1) Ambion, Darmstadt	sense: 5'-GCG ACU UCG UGU CUA AAG Utt-3' antisense: 5'-ACU UAA GAC ACG AAG UGC Gtt-3'
JunB (2) Ambion, Darmstadt	sense: 5'-CAU ACG CAG CGG CAG GAU Att-3' antisense: 5'-UAU CCU GCC GCU GCG UAU Gag-3'
Klf6 (1) selbst-hergestellt*	sense: 5'-AAT TCA GGA AAT GAT TGG TGG CCT GTC TC-3' antisense: 5'-GAC CAC CAA TCA TTT CCT GAA CCT GTC TC-3'
Klf6 (2)	sense: 5'-AAT TAT AAT TAA AGC CGG AGC CCT GTC TC-3'

selbst-hergestellt*	antisense: 5'-CAG CTC CGG CTT TAA TTA TAA CCT GTC TC-3'
Otx1 (1) selbst-hergestellt*	sense: 5'-AAT AGG ACA TAG GGT AGG AGG CCT GTC TC-3' antisense 5'-GAC CTC CTA CCC TAT GTC CTA CCT GTC TC-3'
Otx1 (2) selbst-hergestellt*	sense:5'-AAT GAA GAT TGG CTC AGT GGG CCT GTC TC-3' antisense: 5'-CAC CCA CTG AGC CAA TCT TCA CCT GTC TC-3'
RelA (1) selbst-hergestellt*	sense: 5'-AAG TTA GGA TGA TGT GCG TCG CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAC GAC GCA CAT CAT CCT AAC CCT GTC TC-3'
RelA (2) Ambion, Darmstadt	sense: 5'-CCG GAU UGA AGA AAA ACG Ctt-3' antisense: 5'-GCG UUU UUC UUC AAU CCG Gtg-3'
Scramble (Sc) selbst-hergestellt*	sense: 5'-AAG CGA AGC CCA TTA CCC CTT CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAA AGG GTT AAT GGG CTT CGC CCT GTC TC-3'

*Alle selbst-hergestellten siRNA-Duplexe wurden mit Silencer®siRNA Construction Kit und Primern von Eurofins MWG GmbH, Ebersberg hergestellt.

5.6 Primer für RT-PCR

Fosl1	f: 5'-TCC AGG ACC CGT ACT TGA AC-3' r: 5'-GAT GAC AAC GGG TAG CAC CT-3'
Gfi1	f: 5'-CCT GGT CAA GAG CAA GAA GG-3' r: 5'-CTG TCT GGA GCC TCG GTA AG-3'
Hmga2	f: 5'-GGG ACA CAG TTT AAC AAT GC-3' r: 5'-GTG TCT ACA AGA TTA TAC GC-3'
JunB	f: 5'-CCT GAC CCG AAA AGT AGC TG-3' r: 5'-ATG TGC TCG AAA ATG GAA CA-3'
Klf6	f: 5'-GAG TTC CTC GGT CAT TTC CA-3' r: 5'-TGC TTT CAA GTG GGA GCT TT-3'
Otx1	f: 5'-GTT CGC AAA GAC TCG CTA CC-3' r: 5'-CCG GAG ACG ACT TCT TCT TG-3'
RelA	f: 5'-GAC CAG GAA GTC AGC GAG TC-3' r: 5'-GAT GTG GCA ATG CAT TTG AG-3'
Gapdh	f: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' r: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

Primer von Eurofins MWG GmbH, Ebersberg.

5.7 Antikörper

primäre Antikörper:	Inkubation ÜN, 4 °C	
Akt, 9272	1:1000, 5 % BSA	Cell signaling, Frankfurt
Erk1/2, 61000 30/31	1:500, TBST, RT, 1 h	BD, Heidelberg
Fosl1 (R-20), sc-605	1:1000, 10 % MM	Santa Cruz, Heidelberg
Gapdh (FL-335), sc-25778	1:1000, 10 % MM	Santa Cruz, Heidelberg
Gfi1, ARP32557	1:2000, 5 % MM	Aviva systems biology, USA
Histone H3, 9715	1:1000, 5 % MM	Cell signaling, Frankfurt
Hmga2, ARP38356	1:500, 10 % MM	Aviva systems biology, USA
JunB (210), sc-73	1:1000, 10 % MM	Santa Cruz, Heidelberg
Klf6 (R-173), sc-7158	1:1000, 10 % MM	Santa Cruz, Heidelberg
Mek1/2, 9122	1:1000, 5 % BSA	Cell signaling, Frankfurt
Otx1, ARP39103	1:500, 5 % MM	Aviva systems biology, USA
pAkt (Ser473), 9271	1:1000, 5 % BSA	Cell signaling, Frankfurt
panRas (v12), 0B38	1:1000, TBST	Calbioch, USA
pErk1/2 (Thr202/Tyr204), 9101	1:1000, 5 % BSA	Cell signaling, Frankfurt
pMek1/2 (Ser217/221), 9121	1:500, 5 % BSA	Cell signaling, Frankfurt
RelA (C-20), sc-372	1:2000, 10 % MM	Santa Cruz, Heidelberg
β-Tubulin, 2146	1:1000, 5 % MM	Cell signaling, Frankfurt
sekundäre Antikörper:	Inkubation RT, 1 h	
Goat anti-rabbit HRP, 7074	1:2000, 5 % MM	Cell signaling, Frankfurt
Goat anti-mouse HRP, 325-035-045	1:5000, 5 % MM	Dianova, Hamburg

5.8 Zelllinien

Rose 199	Tchernitsa et al., 2004
Rose A2/5	Adams und Auersperg, 1985

5.9 Computer-Programme

Bildbearbeitung/Analyse	Adobe Photoshop 5.0	Adobe, USA
FACS	Cylchred	Joseph Trotter, USA
	WinMDI 2.8	Joseph Trotter, USA
Grafikprogramm/Statistik	GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software, USA
Microarray-Auswertung	ImaGene	BioDiscovery, USA
Hierarchische Clusteranalyse	Hierarchical clustering explorer version 3.0	University of Maryland, USA

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Akt	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
Ap-1	Activator protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
Bax	BCL2-associated X protein
BSA	Bovine serum albumine
cDNA	Zu mRNA komplementäre DNA
°C	Grad Celsius
DEPC	Diethylprocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DOC	Natriumdesoxycholat
EDTA	Titriplex III
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
FCS	Fötales Kälberserum
Fosl1	Fos-related antigen 1, AP-1
Gfi1	Growth factor independent 1
h	Stunde
Hmga2	High mobility group AT-hook 2
H-Ras	Harvey rat sarcoma virus oncogene
JunB	Jun B proto-oncogene
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Klf6	Kruppel-like factor 6
Knock-down	Abnahme der Ziel-mRNA und des kodierten Proteins infolge von siRNA-Interferenz
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRAS-abhängig	Differenziell exprimierte Gene im Rose Zellsystem
log ₂	Der Logarithmus zur Basis 2
LY294002	PI-3-K-spezifischer Inhibitor
Mek	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
min	Minute
MM	Magermilch
Mock	Zellen nach Zugabe der Transfektionsreagenz
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte
Otx1	Orthodenticle homolog 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAkt, pErk, pMek	Phosphoryliertes Akt, Erk, Mek
PI-3-K	Phosphoinositide-3-kinase
PolyHEMA	Poly-2-Hydroxyethyl-Methacrylate
Raf	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog

RASTA	Ras signaling target array
RelA	Nuclear factor NF-kappaB p65 subunit
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonucleic acid
Rose	Rat ovarian surface epithelium
Rose A2/5 Zellen	KRAS-transformierte Derivate von Rose 199 Zellen
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Sc	siRNA-Duplex mit Zufalls-Sequenz, scrambled
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecysulfat
sek	Sekunde
SEM	Standard Fehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
u.a.	Unter anderem
U0126	Mek1/2-spezifischer Inhibitor
ÜN	Über Nacht
vgl.	vergleiche
XTT	Sodium 3,3'-[4-(2,4,6-trinitrophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazol-3-yl]-3,4-dihydroxybenzenesulfonic acid hydrate
%	Prozent

7 Literatur

- Abe, N.; Watanabe, T.; Suzuki, Y.; Matsumoto, N.; Masaki, T.; Mori, T.; Sugiyama, M.; Chiappetta, G.; Fusco, A. and Atomi, Y. (2003): An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue, *Br J Cancer* 89 [11], pp. 2104-9.
- Acampora, D.; Avantaggiato, V.; Tuorto, F.; Barone, P.; Perera, M.; Choo, D.; Wu, D.; Corte, G. and Simeone, A. (1999): Differential transcriptional control as the major molecular event in generating Otx1^{-/-} and Otx2^{-/-} divergent phenotypes, *Development* 126 [7], pp. 1417-26.
- Adams, A. T. and Auersperg, N. (1985): A cell line, ROSE 199, derived from normal rat ovarian surface epithelium, *Exp Cell Biol* 53 [4], pp. 181-8.
- Adiseshaiah, P.; Peddakama, S.; Zhang, Q.; Kalvakolanu, D. V. and Reddy, S. P. (2005): Mitogen regulated induction of FRA-1 proto-oncogene is controlled by the transcription factors binding to both serum and TPA response elements, *Oncogene* 24 [26], pp. 4193-205.
- Agapova, L. S.; Volodina, J. L.; Chumakov, P. M. and Kopnin, B. P. (2004): Activation of Ras-Ral pathway attenuates p53-independent DNA damage G2 checkpoint, *J Biol Chem* 279 [35], pp. 36382-9.
- Andl, C. D.; Mizushima, T.; Nakagawa, H.; Oyama, K.; Harada, H.; Chruma, K.; Herlyn, M. and Rustgi, A. K. (2003): Epidermal growth factor receptor mediates increased cell proliferation, migration, and aggregation in esophageal keratinocytes in vitro and in vivo, *J Biol Chem* 278 [3], pp. 1824-30.
- Ayoubi, T. A.; Jansen, E.; Meulemans, S. M. and Van de Ven, W. J. (1999): Regulation of HMGIC expression: an architectural transcription factor involved in growth control and development, *Oncogene* 18 [36], pp. 5076-87.
- Bakiri, L.; Matsuo, K.; Wisniewska, M.; Wagner, E. F. and Yaniv, M. (2002): Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers, *Mol Cell Biol* 22 [13], pp. 4952-64.
- Banck, M. S.; Beaven, S. W.; Narla, G.; Walsh, M. J.; Friedman, S. L. and Beutler, A. S. (2006): KLF6 degradation after apoptotic DNA damage, *FEBS Lett* 580 [30], pp. 6981-6.
- Bartlett, D. W. and Davis, M. E. (2007): Effect of siRNA nuclease stability on the in vitro and in vivo kinetics of siRNA-mediated gene silencing, *Biotechnol Bioeng* 97 [4], pp. 909-21.
- Battista, S.; de Nigris, F.; Fedele, M.; Chiappetta, G.; Scala, S.; Vallone, D.; Pierantoni, G. M.; Mega, T.; Santoro, M.; Viglietto, G.; Verde, P. and Fusco, A. (1998): Increase in AP-1 activity is a general event in thyroid cell transformation in vitro and in vivo, *Oncogene* 17 [3], pp. 377-85.
- Beg, A. A.; Sha, W. C.; Bronson, R. T.; Ghosh, S. and Baltimore, D. (1995): Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B, *Nature* 376 [6536], pp. 167-70.
- Belge, G.; Meyer, A.; Klemke, M.; Burchardt, K.; Stern, C.; Wosniok, W.; Loeschke, S. and Bullerdiek, J. (2008): Upregulation of HMGA2 in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias, *Genes Chromosomes Cancer* 47 [1], pp. 56-63.
- Belguise, K.; Kersual, N.; Galtier, F. and Chalbos, D. (2005): FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells, *Oncogene* 24 [8], pp. 1434-44.

- Bellovin, D. I.; Bates, R. C.; Muzikansky, A.; Rimm, D. L. and Mercurio, A. M. (2005): Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease, *Cancer Res* 65 [23], pp. 10938-45.
- Berlingieri, M. T.; Manfioletti, G.; Santoro, M.; Bandiera, A.; Visconti, R.; Giancotti, V. and Fusco, A. (1995): Inhibition of HMGI-C protein synthesis suppresses retrovirally induced neoplastic transformation of rat thyroid cells, *Mol Cell Biol* 15 [3], pp. 1545-53.
- Bhalla, U. S. and Iyengar, R. (1999): Emergent properties of networks of biological signaling pathways, *Science* 283 [5400], pp. 381-7.
- Black, A. R.; Black, J. D. and Azizkhan-Clifford, J. (2001): Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer, *J Cell Physiol* 188 [2], pp. 143-60.
- Bluthgen, N.; Legewie, S.; Kielbasa, S. M.; Schramme, A.; Tchernitsa, O.; Keil, J.; Solf, A.; Vingron, M.; Schafer, R.; Herzel, H. and Sers, C. (2009): A systems biological approach suggests that transcriptional feedback regulation by dual-specificity phosphatase 6 shapes extracellular signal-related kinase activity in RAS-transformed fibroblasts, *Febs J* 276 [4], pp. 1024-35.
- Boring, C. C.; Squires, T. S. and Health, C. W., Jr. (1992): Cancer statistics for African Americans, *CA Cancer J Clin* 42 [1], pp. 7-17.
- Bos, J. L. (1989): ras oncogenes in human cancer: a review, *Cancer Res* 49 [17], pp. 4682-9.
- Breccia, M.; Frustaci, A. M.; Cannella, L.; Soverini, S.; Stefanizzi, C.; Federico, V.; Grammatico, S.; Santopietro, M. and Alimena, G. (2009): Sequential development of mutant clones in an imatinib resistant chronic myeloid leukaemia patient following sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors: an emerging problem?, *Cancer Chemother Pharmacol* 64 [1], pp. 195-7.
- Casalino, L.; Bakiri, L.; Talotta, F.; Weitzman, J. B.; Fusco, A.; Yaniv, M. and Verde, P. (2007): Fra-1 promotes growth and survival in RAS-transformed thyroid cells by controlling cyclin A transcription, *Embo J* 26 [7], pp. 1878-90.
- Casalino, L.; De Cesare, D. and Verde, P. (2003): Accumulation of Fra-1 in ras-transformed cells depends on both transcriptional autoregulation and MEK-dependent posttranslational stabilization, *Mol Cell Biol* 23 [12], pp. 4401-15.
- Cheung, M.; Chaboissier, M. C.; Mynett, A.; Hirst, E.; Schedl, A. and Briscoe, J. (2005): The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination, *Dev Cell* 8 [2], pp. 179-92.
- Chiappetta, G.; Ferraro, A.; Vuttariello, E.; Monaco, M.; Galdiero, F.; De Simone, V.; Califano, D.; Pallante, P.; Botti, G.; Pezzullo, L.; Pierantoni, G. M.; Santoro, M. and Fusco, A. (2008): HMGA2 mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias, *Eur J Cancer* 44 [7], pp. 1015-21.
- Cho, Y. G.; Kim, C. J.; Park, C. H.; Yang, Y. M.; Kim, S. Y.; Nam, S. W.; Lee, S. H.; Yoo, N. J.; Lee, J. Y. and Park, W. S. (2005): Genetic alterations of the KLF6 gene in gastric cancer, *Oncogene* 24 [28], pp. 4588-90.
- Crish, J. F.; Bone, F.; Banks, E. B. and Eckert, R. L. (2002): The human involucrin gene contains spatially distinct regulatory elements that regulate expression during early versus late epidermal differentiation, *Oncogene* 21 [5], pp. 738-47.
- de Haas, T.; Oussoren, E.; Grajkowska, W.; Perek-Polnik, M.; Popovic, M.; Zdravcevic-Zaletel, L.; Perera, M.; Corte, G.; Wirths, O.; van Sluis, P.; Pietsch, T.; Troost, D.; Baas, F.; Versteeg, R. and Kool, M. (2006): OTX1 and OTX2

- expression correlates with the clinicopathologic classification of medulloblastomas, *J Neuropathol Exp Neurol* 65 [2], pp. 176-86.
- Dey, A.; Wong, E.; Kua, N.; Teo, H. L.; Tergaonkar, V. and Lane, D. (2008): Hexamethylene bisacetamide (HMBA) simultaneously targets AKT and MAPK pathway and represses NF kappaB activity: implications for cancer therapy, *Cell Cycle* 7 [23], pp. 3759-67.
- DiFeo, A.; Narla, G.; Hirshfeld, J.; Camacho-Vanegas, O.; Narla, J.; Rose, S. L.; Kalir, T.; Yao, S.; Levine, A.; Birrer, M. J.; Bonome, T.; Friedman, S. L.; Buller, R. E. and Martignetti, J. A. (2006): Roles of KLF6 and KLF6-SV1 in ovarian cancer progression and intraperitoneal dissemination, *Clin Cancer Res* 12 [12], pp. 3730-9.
- Dwivedi, P. P.; Anderson, P. H.; Tilley, W. D.; May, B. K. and Morris, H. A. (2007): Role of oncoprotein growth factor independent-1 (GFI1) in repression of 25-hydroxyvitamin D 1alpha-hydroxylase (CYP27B1): a comparative analysis in human prostate cancer and kidney cells, *J Steroid Biochem Mol Biol* 103 [3-5], pp. 742-6.
- Eastham, A. M.; Spencer, H.; Soncin, F.; Ritson, S.; Merry, C. L.; Stern, P. L. and Ward, C. M. (2007): Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation, *Cancer Res* 67 [23], pp. 11254-62.
- Edelstein, L. C.; Lagos, L.; Simmons, M.; Tirumalai, H. and Gelinas, C. (2003): NF-kappa B-dependent assembly of an enhanceosome-like complex on the promoter region of apoptosis inhibitor Bfl-1/A1, *Mol Cell Biol* 23 [8], pp. 2749-61.
- Ehlert, J. E. and Kubbutat, M. H. (2001): Apoptosis and its relevance in cancer therapy, *Onkologie* 24 [5], pp. 433-40.
- Farras, R.; Baldin, V.; Gallach, S.; Acquaviva, C.; Bossis, G.; Jariel-Encontre, I. and Piechaczyk, M. (2008): JunB breakdown in mid-/late G2 is required for down-regulation of cyclin A2 levels and proper mitosis, *Mol Cell Biol* 28 [12], pp. 4173-87.
- Gallagher, W. M. and Brown, R. (1999): p53-oriented cancer therapies: current progress, *Ann Oncol* 10 [2], pp. 139-50.
- Gilks, C. B.; Bear, S. E.; Grimes, H. L. and Tschlis, P. N. (1993): Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein, *Mol Cell Biol* 13 [3], pp. 1759-68.
- Goel, A.; Arnold, C. N.; Niedzwiecki, D.; Chang, D. K.; Ricciardiello, L.; Carethers, J. M.; Dowell, J. M.; Wasserman, L.; Compton, C.; Mayer, R. J.; Bertagnolli, M. M. and Boland, C. R. (2003): Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability, *Cancer Res* 63 [7], pp. 1608-14.
- Grassme, H.; Jin, J.; Wilker, B.; von Kurthy, G.; Wick, W.; Weller, M.; Moroy, T. and Gulbins, E. (2006): Regulation of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection by the transcriptional repressor Gfi1, *Cell Microbiol* 8 [7], pp. 1096-105.
- Greenbaum, D.; Jansen, R. and Gerstein, M. (2002): Analysis of mRNA expression and protein abundance data: an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts, *Bioinformatics* 18 [4], pp. 585-96.
- Grimes, H. L.; Chan, T. O.; Zweidler-McKay, P. A.; Tong, B. and Tschlis, P. N. (1996): The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal, *Mol Cell Biol* 16 [11], pp. 6263-72.

- Grimes, H. L.; Gilks, C. B.; Chan, T. O.; Porter, S. and Tschlis, P. N. (1996): The Gfi-1 protooncoprotein represses Bax expression and inhibits T-cell death, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [25], pp. 14569-73.
- Gupta, P. B.; Mani, S.; Yang, J.; Hartwell, K. and Weinberg, R. A. (2005): The evolving portrait of cancer metastasis, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70, pp. 291-7.
- Hammond, S. M. (2005): Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway, *FEBS Lett* 579 [26], pp. 5822-9.
- Hatzimanikatis, V.; Choe, L. H. and Lee, K. H. (1999): Proteomics: theoretical and experimental considerations, *Biotechnol Prog* 15 [3], pp. 312-8.
- Hirai, S. I.; Ryseck, R. P.; Mechta, F.; Bravo, R. and Yaniv, M. (1989): Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family, *Embo J* 8 [5], pp. 1433-9.
- Hiyama, T.; Tanaka, S.; Yoshihara, M.; Sasao, S.; Kose, K.; Shima, H.; Tuncel, H.; Ueno, Y.; Ito, M.; Kitadai, Y.; Yasui, W.; Haruma, K. and Chayama, K. (2004): Chromosomal and microsatellite instability in sporadic gastric cancer, *J Gastroenterol Hepatol* 19 [7], pp. 756-60.
- Hock, R.; Furusawa, T.; Ueda, T. and Bustin, M. (2007): HMG chromosomal proteins in development and disease, *Trends Cell Biol* 17 [2], pp. 72-9.
- Hoffman, A. G.; Burghardt, R. C.; Tilley, R. and Auersperg, N. (1993): An in vitro model of ovarian epithelial carcinogenesis: changes in cell-cell communication and adhesion occurring during neoplastic progression, *Int J Cancer* 54 [5], pp. 828-38.
- Hotz, B.; Arndt, M.; Dullat, S.; Bhargava, S.; Buhr, H. J. and Hotz, H. G. (2007): Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer, *Clin Cancer Res* 13 [16], pp. 4769-76.
- Hristov, A. C.; Cope, L.; Reyes, M. D.; Singh, M.; Iacobuzio-Donahue, C.; Maitra, A. and Resar, L. M. (2009): HMGA2 protein expression correlates with lymph node metastasis and increased tumor grade in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Mod Pathol* 22 [1], pp. 43-9.
- Hu, W.; Feng, Z. and Tang, M. S. (2003): Preferential carcinogen-DNA adduct formation at codons 12 and 14 in the human KRAS gene and their possible mechanisms, *Biochemistry* 42 [33], pp. 10012-23.
- Hunter, T. (1995): Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling, *Cell* 80 [2], pp. 225-36.
- Hurd, T. W.; Culbert, A. A.; Webster, K. J. and Tavaré, J. M. (2002): Dual role for mitogen-activated protein kinase (Erk) in insulin-dependent regulation of Fra-1 (fos-related antigen-1) transcription and phosphorylation, *Biochem J* 368 [Pt 2], pp. 573-80.
- Ito, G.; Uchiyama, M.; Kondo, M.; Mori, S.; Usami, N.; Maeda, O.; Kawabe, T.; Hasegawa, Y.; Shimokata, K. and Sekido, Y. (2004): Kruppel-like factor 6 is frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells, *Cancer Res* 64 [11], pp. 3838-43.
- Iwasa, A.; Oda, Y.; Kurihara, S.; Ohishi, Y.; Yasunaga, M.; Nishimura, I.; Takagi, E.; Kobayashi, H.; Wake, N. and Tsuneyoshi, M. (2008): Malignant transformation of mature cystic teratoma to squamous cell carcinoma involves altered expression of p53- and p16/Rb-dependent cell cycle regulator proteins, *Pathol Int* 58 [12], pp. 757-64.
- Jethwa, P.; Naqvi, M.; Hardy, R. G.; Hotchin, N. A.; Roberts, S.; Spychal, R. and Tselepis, C. (2008): Overexpression of Slug is associated with malignant progression of esophageal adenocarcinoma, *World J Gastroenterol* 14 [7], pp. 1044-52.

- Kang, Y. and Massague, J. (2004): Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis, *Cell* 118 [3], pp. 277-9.
- Kanzler, B.; Viallet, J. P.; Le Mouellic, H.; Boncinelli, E.; Duboule, D. and Dhouailly, D. (1994): Differential expression of two different homeobox gene families during mouse tegument morphogenesis, *Int J Dev Biol* 38 [4], pp. 633-40.
- Karin, M.; Cao, Y.; Greten, F. R. and Li, Z. W. (2002): NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit, *Nat Rev Cancer* 2 [4], pp. 301-10.
- Karsunky, H.; Mende, I.; Schmidt, T. and Moroy, T. (2002): High levels of the onco-protein Gfi-1 accelerate T-cell proliferation and inhibit activation induced T-cell death in Jurkat T-cells, *Oncogene* 21 [10], pp. 1571-9.
- Kastritis, E.; Charidimou, A.; Varkaris, A. and Dimopoulos, M. A. (2009): Targeted therapies in multiple myeloma, *Target Oncol* 4 [1], pp. 23-36.
- Kholodenko, B. N.; Kiyatkin, A.; Bruggeman, F. J.; Sontag, E.; Westerhoff, H. V. and Hoek, J. B. (2002): Untangling the wires: a strategy to trace functional interactions in signaling and gene networks, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [20], pp. 12841-6.
- Kingsley, C. and Winoto, A. (1992): Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression, *Mol Cell Biol* 12 [10], pp. 4251-61.
- Kolch, W. (2000): Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions, *Biochem J* 351 Pt 2, pp. 289-305.
- Koldehoff, M.; Steckel, N. K.; Beelen, D. W. and Elmaagaccli, A. H. (2007): Therapeutic application of small interfering RNA directed against bcr-abl transcripts to a patient with imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia, *Clin Exp Med* 7 [2], pp. 47-55.
- Kolfschoten, I. G.; van Leeuwen, B.; Berns, K.; Mullenders, J.; Beijersbergen, R. L.; Bernards, R.; Voorhoeve, P. M. and Agami, R. (2005): A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity, *Cell* 121 [6], pp. 849-58.
- Kurrey, N. K.; K, A. and Bapat, S. A. (2005): Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level, *Gynecol Oncol* 97 [1], pp. 155-65.
- Langelotz, C.; Schmid, P.; Jakob, C.; Heider, U.; Wernecke, K. D.; Possinger, K. and Sezer, O. (2003): Expression of high-mobility-group-protein HMGI-C mRNA in the peripheral blood is an independent poor prognostic indicator for survival in metastatic breast cancer, *Br J Cancer* 88 [9], pp. 1406-10.
- Leaner, V. D.; Chick, J. F.; Donninger, H.; Linniola, I.; Mendoza, A.; Khanna, C. and Birrer, M. J. (2009): Inhibition of AP-1 transcriptional activity blocks the migration, invasion, and experimental metastasis of murine osteosarcoma, *Am J Pathol* 174 [1], pp. 265-75.
- Lengauer, C.; Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1997): Genetic instability in colorectal cancers, *Nature* 386 [6625], pp. 623-7.
- Lerebours, F.; Vacher, S.; Andrieu, C.; Espie, M.; Marty, M.; Lidereau, R. and Bieche, I. (2008): NF-kappa B genes have a major role in inflammatory breast cancer, *BMC Cancer* 8, p. 41.
- Levantini, E.; Giorgetti, A.; Cerisoli, F.; Traggiai, E.; Guidi, A.; Martin, R.; Acampora, D.; Aplan, P. D.; Keller, G.; Simeone, A.; Iscove, N. N.; Hoang, T. and Magli, M. C. (2003): Unsuspected role of the brain morphogenetic gene Otx1 in hematopoiesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [18], pp. 10299-303.
- Li, G. and Ho, V. C. (1998): p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation, *Br J Dermatol* 139 [1], pp. 3-10.

- Li, O.; Li, J. and Droge, P. (2007): DNA architectural factor and proto-oncogene HMGA2 regulates key developmental genes in pluripotent human embryonic stem cells, *FEBS Lett* 581 [18], pp. 3533-7.
- Li, O.; Vasudevan, D.; Davey, C. A. and Droge, P. (2006): High-level expression of DNA architectural factor HMGA2 and its association with nucleosomes in human embryonic stem cells, *Genesis* 44 [11], pp. 523-9.
- Lin, J. C.; Yang, S. C.; Hong, T. M.; Yu, S. L.; Shi, Q.; Wei, L.; Chen, H. Y.; Yang, P. C. and Lee, K. H. (2009): Phenanthrene-based tylophorine-1 (PBT-1) inhibits lung cancer cell growth through the Akt and NF-kappaB pathways, *J Med Chem* 52 [7], pp. 1903-11.
- Liu, R.; Zheng, H. Q.; Zhou, Z.; Dong, J. T. and Chen, C. (2009): KLF5 Promotes Breast Cell Survival Partially through Fibroblast Growth Factor-binding Protein 1-pERK-mediated Dual Specificity MKP-1 Protein Phosphorylation and Stabilization, *J Biol Chem* 284 [25], pp. 16791-8.
- Liu, Y.; Elf, S. E.; Miyata, Y.; Sashida, G.; Liu, Y.; Huang, G.; Di Giandomenico, S.; Lee, J. M.; Deblasio, A.; Menendez, S.; Antipin, J.; Reva, B.; Koff, A. and Nimer, S. D. (2009): p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence, *Cell Stem Cell* 4 [1], pp. 37-48.
- Lu, J.; Tan, M.; Huang, W. C.; Li, P.; Guo, H.; Tseng, L. M.; Su, X. H.; Yang, W. T.; Treekitkarnmongkol, W.; Andreeff, M.; Symmans, F. and Yu, D. (2009): Mitotic deregulation by survivin in ErbB2-overexpressing breast cancer cells contributes to Taxol resistance, *Clin Cancer Res* 15 [4], pp. 1326-34.
- Madrid, L. V.; Wang, C. Y.; Guttridge, D. C.; Schottelius, A. J.; Baldwin, A. S., Jr. and Mayo, M. W. (2000): Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB, *Mol Cell Biol* 20 [5], pp. 1626-38.
- Malek, A.; Bakhidze, E.; Noske, A.; Sers, C.; Aigner, A.; Schafer, R. and Tchernitsa, O. (2008): HMGA2 gene is a promising target for ovarian cancer silencing therapy, *Int J Cancer* 123 [2], pp. 348-56.
- Manfioletti, G.; Giancotti, V.; Bandiera, A.; Buratti, E.; Sautiere, P.; Cary, P.; Crane-Robinson, C.; Coles, B. and Goodwin, G. H. (1991): cDNA cloning of the HMGI-C phosphoprotein, a nuclear protein associated with neoplastic and undifferentiated phenotypes, *Nucleic Acids Res* 19 [24], pp. 6793-7.
- Mani, S. A.; Guo, W.; Liao, M. J.; Eaton, E. N.; Ayyanan, A.; Zhou, A. Y.; Brooks, M.; Reinhard, F.; Zhang, C. C.; Shipitsin, M.; Campbell, L. L.; Polyak, K.; Briskin, C.; Yang, J. and Weinberg, R. A. (2008): The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells, *Cell* 133 [4], pp. 704-15.
- Mantovani, F.; Covaceuszach, S.; Rustighi, A.; Sgarra, R.; Heath, C.; Goodwin, G. H. and Manfioletti, G. (1998): NF-kappaB mediated transcriptional activation is enhanced by the architectural factor HMGI-C, *Nucleic Acids Res* 26 [6], pp. 1433-9.
- Marshall, M. S. (1995): Ras target proteins in eukaryotic cells, *Faseb J* 9 [13], pp. 1311-8.
- Marteijn, J. A.; van der Meer, L. T.; Van Emst, L.; de Witte, T.; Jansen, J. H. and van der Reijden, B. A. (2007): Diminished proteasomal degradation results in accumulation of Gfi1 protein in monocytes, *Blood* 109 [1], pp. 100-8.
- Matsumoto, N.; Kubo, A.; Liu, H.; Akita, K.; Laub, F.; Ramirez, F.; Keller, G. and Friedman, S. L. (2006): Developmental regulation of yolk sac hematopoiesis by Kruppel-like factor 6, *Blood* 107 [4], pp. 1357-65.
- Mayo, M. W.; Wang, C. Y.; Cogswell, P. C.; Rogers-Graham, K. S.; Lowe, S. W.; Der, C. J. and Baldwin, A. S., Jr. (1997): Requirement of NF-kappaB activation to

- suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras, *Science* 278 [5344], pp. 1812-5.
- McGhee, L.; Bryan, J.; Elliott, L.; Grimes, H. L.; Kazanjian, A.; Davis, J. N. and Meyers, S. (2003): Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8) and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism, *J Cell Biochem* 89 [5], pp. 1005-18.
- Meyer, B.; Loeschke, S.; Schultze, A.; Weigel, T.; Sandkamp, M.; Goldmann, T.; Vollmer, E. and Bullerdiek, J. (2007): HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer, *Mol Carcinog* 46 [7], pp. 503-11.
- Moelling, K.; Schad, K.; Bosse, M.; Zimmermann, S. and Schweneker, M. (2002): Regulation of Raf-Akt Cross-talk, *J Biol Chem* 277 [34], pp. 31099-106.
- Moffat, J. and Sabatini, D. M. (2006): Building mammalian signalling pathways with RNAi screens, *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 [3], pp. 177-87.
- Motoyama, K.; Inoue, H.; Nakamura, Y.; Uetake, H.; Sugihara, K. and Mori, M. (2008): Clinical significance of high mobility group A2 in human gastric cancer and its relationship to let-7 microRNA family, *Clin Cancer Res* 14 [8], pp. 2334-40.
- Narla, G.; Difeo, A.; Reeves, H. L.; Schaid, D. J.; Hirshfeld, J.; Hod, E.; Katz, A.; Isaacs, W. B.; Hebring, S.; Komiya, A.; McDonnell, S. K.; Wiley, K. E.; Jacobsen, S. J.; Isaacs, S. D.; Walsh, P. C.; Zheng, S. L.; Chang, B. L.; Friedrichsen, D. M.; Stanford, J. L.; Ostrander, E. A.; Chinnaiyan, A. M.; Rubin, M. A.; Xu, J.; Thibodeau, S. N.; Friedman, S. L. and Martignetti, J. A. (2005): A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk, *Cancer Res* 65 [4], pp. 1213-22.
- Narla, G.; DiFeo, A.; Yao, S.; Banno, A.; Hod, E.; Reeves, H. L.; Qiao, R. F.; Camacho-Vanegas, O.; Levine, A.; Kirschenbaum, A.; Chan, A. M.; Friedman, S. L. and Martignetti, J. A. (2005): Targeted inhibition of the KLF6 splice variant, KLF6 SV1, suppresses prostate cancer cell growth and spread, *Cancer Res* 65 [13], pp. 5761-8.
- Nesterov, A.; Nikrad, M.; Johnson, T. and Kraft, A. S. (2004): Oncogenic Ras sensitizes normal human cells to tumor necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis, *Cancer Res* 64 [11], pp. 3922-7.
- Ngo, H.; Tschudi, C.; Gull, K. and Ullu, E. (1998): Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [25], pp. 14687-92.
- Nieto, M. A. (2008): Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives, *Int J Dev Biol*.
- O'Shea, E. K.; Rutkowski, R. and Kim, P. S. (1992): Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer, *Cell* 68 [4], pp. 699-708.
- Oberhuber, H.; Seliger, B. and Schafer, R. (1995): Partial restoration of pre-transformation levels of lysyl oxidase and transin mRNAs in phenotypic ras revertants, *Mol Carcinog* 12 [4], pp. 198-204.
- Palacios, F.; Tushir, J. S.; Fujita, Y. and D'Souza-Schorey, C. (2005): Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions, *Mol Cell Biol* 25 [1], pp. 389-402.
- Pervin, S.; Singh, R.; Freije, W. A. and Chaudhuri, G. (2003): MKP-1-induced dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase is essential for triggering nitric oxide-induced apoptosis in human breast cancer cell lines: implications in breast cancer, *Cancer Res* 63 [24], pp. 8853-60.

- Raghavan, A.; Ogilvie, R. L.; Reilly, C.; Abelson, M. L.; Raghavan, S.; Vasdewani, J.; Krathwohl, M. and Bohjanen, P. R. (2002): Genome-wide analysis of mRNA decay in resting and activated primary human T lymphocytes, *Nucleic Acids Res* 30 [24], pp. 5529-38.
- Reeves, R. and Beckerbauer, L. (2001): HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure, *Biochim Biophys Acta* 1519 [1-2], pp. 13-29.
- Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F. and Weissman, I. L. (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature* 414 [6859], pp. 105-11.
- Robert, V.; Michel, P.; Flaman, J. M.; Chiron, A.; Martin, C.; Charbonnier, F.; Paillot, B. and Frebourg, T. (2000): High frequency in esophageal cancers of p53 alterations inactivating the regulation of genes involved in cell cycle and apoptosis, *Carcinogenesis* 21 [4], pp. 563-5.
- Roberts, A. B.; Tian, F.; Byfield, S. D.; Stuelten, C.; Ooshima, A.; Saika, S. and Flanders, K. C. (2006): Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis, *Cytokine Growth Factor Rev* 17 [1-2], pp. 19-27.
- Rodriguez-Viciano, P.; Warne, P. H.; Dhand, R.; Vanhaesebroeck, B.; Gout, I.; Fry, M. J.; Waterfield, M. D. and Downward, J. (1994): Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras, *Nature* 370 [6490], pp. 527-32.
- Rogalla, P.; Drechsler, K.; Frey, G.; Hennig, Y.; Helmke, B.; Bonk, U. and Bullerdiek, J. (1996): HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors, *Am J Pathol* 149 [3], pp. 775-9.
- Rogalla, P.; Drechsler, K.; Kazmierczak, B.; Rippe, V.; Bonk, U. and Bullerdiek, J. (1997): Expression of HMGI-C, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancers: relationship to histologic grade, *Mol Carcinog* 19 [3], pp. 153-6.
- Rommel, C.; Clarke, B. A.; Zimmermann, S.; Nunez, L.; Rossman, R.; Reid, K.; Moelling, K.; Yancopoulos, G. D. and Glass, D. J. (1999): Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt, *Science* 286 [5445], pp. 1738-41.
- Ross, S. E.; Erickson, R. L.; Hemati, N. and MacDougald, O. A. (1999): Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase, *Mol Cell Biol* 19 [12], pp. 8433-41.
- Rustighi, A.; Mantovani, F.; Fusco, A.; Giancotti, V. and Manfioletti, G. (1999): Sp1 and CTF/NF-1 transcription factors are involved in the basal expression of the Hmgi-c proximal promoter, *Biochem Biophys Res Commun* 265 [2], pp. 439-47.
- Sabnis, A. J.; Cheung, L. S.; Dail, M.; Kang, H. C.; Santaguida, M.; Hermiston, M. L.; Passegue, E.; Shannon, K. and Braun, B. S. (2009): Oncogenic Kras initiates leukemia in hematopoietic stem cells, *PLoS Biol* 7 [3], p. e59.
- Sage, J.; Mulligan, G. J.; Attardi, L. D.; Miller, A.; Chen, S.; Williams, B.; Theodorou, E. and Jacks, T. (2000): Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization, *Genes Dev* 14 [23], pp. 3037-50.
- Salojin, K. and Oravec, T. (2007): Regulation of innate immunity by MAPK dual-specificity phosphatases: knockout models reveal new tricks of old genes, *J Leukoc Biol* 81 [4], pp. 860-9.
- Salvesen, H. B.; Carter, S. L.; Mannelqvist, M.; Dutt, A.; Getz, G.; Stefansson, I. M.; Raeder, M. B.; Sos, M. L.; Engelsen, I. B.; Trovik, J.; Wik, E.; Greulich, H.; Bo, T. H.; Jonassen, I.; Thomas, R. K.; Zander, T.; Garraway, L. A.; Oyan, A. M.; Sellers, W. R.; Kalland, K. H.; Meyerson, M.; Akslen, L. A. and Beroukhim, R.

- (2009): Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 [12], pp. 4834-9.
- Sangodkar, J.; Shi, J.; DiFeo, A.; Schwartz, R.; Bromberg, R.; Choudhri, A.; McClinch, K.; Hatami, R.; Scheer, E.; Kremer-Tal, S.; Martignetti, J. A.; Hui, A.; Leung, W. K.; Friedman, S. L. and Narla, G. (2009): Functional role of the KLF6 tumour suppressor gene in gastric cancer, *Eur J Cancer* 45 [4], pp. 666-76.
- Schaffner, W. and Weissmann, C. (1973): A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution, *Anal Biochem* 56 [2], pp. 502-14.
- Schleger, C.; Heck, R. and Steinberg, P. (2000): The role of wild-type and mutated N-ras in the malignant transformation of liver cells, *Mol Carcinog* 28 [1], pp. 31-41.
- Schorpp-Kistner, M.; Wang, Z. Q.; Angel, P. and Wagner, E. F. (1999): JunB is essential for mammalian placentation, *Embo J* 18 [4], pp. 934-48.
- Schreiber, M.; Wang, Z. Q.; Jochum, W.; Fetka, I.; Elliott, C. and Wagner, E. F. (2000): Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1, *Development* 127 [22], pp. 4937-48.
- Sers, C.; Kuner, R.; Falk, C. S.; Lund, P.; Sueltmann, H.; Braun, M.; Buness, A.; Ruschhaupt, M.; Conrad, J.; Mang-Fatehi, S.; Stelniec, I.; Krapfenbauer, U.; Poustka, A. and Schafer, R. (2009): Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells, *Int J Cancer* 125 [7], pp. 1626-39.
- Sers, C.; Tchernitsa, O. I.; Zuber, J.; Diatchenko, L.; Zhumabayeva, B.; Desai, S.; Htun, S.; Hyder, K.; Wiechen, K.; Agoulnik, A.; Scharff, K. M.; Siebert, P. D. and Schafer, R. (2002): Gene expression profiling in RAS oncogene-transformed cell lines and in solid tumors using subtractive suppression hybridization and cDNA arrays, *Adv Enzyme Regul* 42, pp. 63-82.
- Sezer, O.; Langelotz, C.; Blohmer, J. U.; Schmid, P.; Akrivakis, K. and Possinger, K. (2000): Detection of HMGI-C in the peripheral blood of breast cancer patients, *Eur J Cancer* 36 [15], pp. 1944-8.
- Shao, Y.; Chan, C. Y.; Maliyekkel, A.; Lawrence, C. E.; Roninson, I. B. and Ding, Y. (2007): Effect of target secondary structure on RNAi efficiency, *Rna* 13 [10], pp. 1631-40.
- Sidransky, D.; Tokino, T.; Helzlsouer, K.; Zehnbaue, B.; Rausch, G.; Shelton, B.; Prestigiacomo, L.; Vogelstein, B. and Davidson, N. (1992): Inherited p53 gene mutations in breast cancer, *Cancer Res* 52 [10], pp. 2984-6.
- Suzuki, H.; Forrest, A. R.; van Nimwegen, E.; Daub, C. O.; Balwierz, P. J.; Irvine, K. M.; Lassmann, T.; Ravasi, T.; Hasegawa, Y.; de Hoon, M. J.; Katayama, S.; Schroder, K.; Carninci, P.; Tomaru, Y.; Kanamori-Katayama, M.; Kubosaki, A.; Akalin, A.; Ando, Y.; Arner, E.; Asada, M.; Asahara, H.; Bailey, T.; Bajic, V. B.; Bauer, D.; Beckhouse, A. G.; Bertin, N.; Bjorkegren, J.; Brombacher, F.; Bulger, E.; Chalk, A. M.; Chiba, J.; Cloonan, N.; Dawe, A.; Dostie, J.; Engstrom, P. G.; Essack, M.; Faulkner, G. J.; Fink, J. L.; Fredman, D.; Fujimori, K.; Furuno, M.; Gojobori, T.; Gough, J.; Grimmond, S. M.; Gustafsson, M.; Hashimoto, M.; Hashimoto, T.; Hatakeyama, M.; Heinzl, S.; Hide, W.; Hofmann, O.; Hornquist, M.; Huminiecki, L.; Ikeo, K.; Imamoto, N.; Inoue, S.; Inoue, Y.; Ishihara, R.; Iwayanagi, T.; Jacobsen, A.; Kaur, M.; Kawaji, H.; Kerr, M. C.; Kimura, R.; Kimura, S.; Kimura, Y.; Kitano, H.; Koga, H.; Kojima, T.; Kondo, S.; Konno, T.; Krogh, A.; Kruger, A.; Kumar, A.; Lenhard, B.; Lennartsson, A.; Lindow, M.; Lizio, M.; Macpherson, C.; Maeda,

- N.; Maher, C. A.; Maqungo, M.; Mar, J.; Matigian, N. A.; Matsuda, H.; Mattick, J. S.; Meier, S.; Miyamoto, S.; Miyamoto-Sato, E.; Nakabayashi, K.; Nakachi, Y.; Nakano, M.; Nygaard, S.; Okayama, T.; Okazaki, Y.; Okuda-Yabukami, H.; Orlando, V.; Otomo, J.; Pachkov, M.; Petrovsky, N.; Plessy, C.; Quackenbush, J.; Radovanovic, A.; Rehli, M.; Saito, R.; Sandelin, A.; Schmeier, S.; Schonbach, C.; Schwartz, A. S.; Semple, C. A.; Sera, M.; Severin, J.; Shirahige, K.; Simons, C.; St Laurent, G.; Suzuki, M.; Suzuki, T.; Sweet, M. J.; Taft, R. J.; Takeda, S.; Takenaka, Y.; Tan, K.; Taylor, M. S.; Teasdale, R. D.; Tegner, J.; Teichmann, S.; Valen, E.; Wahlestedt, C.; Waki, K.; Waterhouse, A.; Wells, C. A.; Winther, O.; Wu, L.; Yamaguchi, K.; Yanagawa, H.; Yasuda, J.; Zavolan, M.; Hume, D. A.; Arakawa, T.; Fukuda, S.; Imamura, K.; Kai, C.; Kaiho, A.; Kawashima, T.; Kawazu, C.; Kitazume, Y.; Kojima, M.; Miura, H.; Murakami, K.; Murata, M.; Ninomiya, N.; Nishiyori, H.; Noma, S.; Ogawa, C.; Sano, T.; Simon, C.; Tagami, M.; Takahashi, Y.; Kawai, J. and Hayashizaki, Y. (2009): The transcriptional network that controls growth arrest and differentiation in a human myeloid leukemia cell line, *Nat Genet* 41 [5], pp. 553-62.
- Tan, H.; Zhong, Y. and Pan, Z. (2009): Autocrine regulation of cell proliferation by estrogen receptor-alpha in estrogen receptor-alpha-positive breast cancer cell lines, *BMC Cancer* 9, p. 31.
- Tchernitsa, O. I.; Sers, C.; Zuber, J.; Hinzmänn, B.; Grips, M.; Schramme, A.; Lund, P.; Schwendel, A.; Rosenthal, A. and Schafer, R. (2004): Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells, *Oncogene* 23 [26], pp. 4536-55.
- Tessari, M. A.; Gostissa, M.; Altamura, S.; Sgarra, R.; Rustighi, A.; Salvagno, C.; Caretti, G.; Imbriano, C.; Mantovani, R.; Del Sal, G.; Giancotti, V. and Manfioletti, G. (2003): Transcriptional activation of the cyclin A gene by the architectural transcription factor HMGA2, *Mol Cell Biol* 23 [24], pp. 9104-16.
- Thiery, J. P. (2003): Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies, *Curr Opin Cell Biol* 15 [6], pp. 740-6.
- Tschuch, C.; Schulz, A.; Pscherer, A.; Werft, W.; Benner, A.; Hotz-Wagenblatt, A.; Barrionuevo, L. S.; Lichter, P. and Mertens, D. (2008): Off-target effects of siRNA specific for GFP, *BMC Mol Biol* 9, p. 60.
- Tusher, V. G.; Tibshirani, R. and Chu, G. (2001): Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [9], pp. 5116-21.
- Vallone, D.; Battista, S.; Pierantoni, G. M.; Fedele, M.; Casalino, L.; Santoro, M.; Viglietto, G.; Fusco, A. and Verde, P. (1997): Neoplastic transformation of rat thyroid cells requires the junB and fra-1 gene induction which is dependent on the HMGI-C gene product, *Embo J* 16 [17], pp. 5310-21.
- van Dam, H. and Castellazzi, M. (2001): Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis, *Oncogene* 20 [19], pp. 2453-64.
- Verstappen, S. M.; Bakker, M. F.; Heurkens, A. H.; van der Veen, M. J.; Kruize, A. A.; Geurts, M. A.; Bijlsma, J. W. and Jacobs, J. W. (2009): Adverse events and factors associated with toxicity in patients with early rheumatoid arthritis treated with methotrexate tight control therapy (the CAMERA study), *Ann Rheum Dis*.
- Vial, E. and Marshall, C. J. (2003): Elevated ERK-MAP kinase activity protects the FOS family member FRA-1 against proteasomal degradation in colon carcinoma cells, *J Cell Sci* 116 [Pt 24], pp. 4957-63.
- Vogt, P. K.; Jiang, H. and Aoki, M. (2005): Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins, *Cell Cycle* 4 [7], pp. 908-13.

- Wallis, D.; Hamblen, M.; Zhou, Y.; Venken, K. J.; Schumacher, A.; Grimes, H. L.; Zoghbi, H. Y.; Orkin, S. H. and Bellen, H. J. (2003): The zinc finger transcription factor Gfi1, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival, *Development* 130 [1], pp. 221-32.
- Wang, G. L.; Iakova, P.; Wilde, M.; Awad, S. and Timchenko, N. A. (2004): Liver tumors escape negative control of proliferation via PI3K/Akt-mediated block of C/EBP alpha growth inhibitory activity, *Genes Dev* 18 [8], pp. 912-25.
- Watanabe, M.; Sasaki, M.; Itoh, K.; Higashihara, M.; Umezawa, K.; Kadin, M. E.; Abraham, L. J.; Watanabe, T. and Horie, R. (2005): JunB induced by constitutive CD30-extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase signaling activates the CD30 promoter in anaplastic large cell lymphoma and reed-sternberg cells of Hodgkin lymphoma, *Cancer Res* 65 [17], pp. 7628-34.
- Watanabe, S.; Ueda, Y.; Akaboshi, S.; Hino, Y.; Sekita, Y. and Nakao, M. (2009): HMGA2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells, *Am J Pathol* 174 [3], pp. 854-68.
- Weitzman, J. B.; Fiette, L.; Matsuo, K. and Yaniv, M. (2000): JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis, *Mol Cell* 6 [5], pp. 1109-19.
- Westbrook, T. F.; Martin, E. S.; Schlabach, M. R.; Leng, Y.; Liang, A. C.; Feng, B.; Zhao, J. J.; Roberts, T. M.; Mandel, G.; Hannon, G. J.; Depinho, R. A.; Chin, L. and Elledge, S. J. (2005): A genetic screen for candidate tumor suppressors identifies REST, *Cell* 121 [6], pp. 837-48.
- Xin, M. and Deng, X. (2005): Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation, *J Biol Chem* 280 [11], pp. 10781-9.
- Yan, J.; Roy, S.; Apolloni, A.; Lane, A. and Hancock, J. F. (1998): Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase, *J Biol Chem* 273 [37], pp. 24052-6.
- Yang, E.; van Nimwegen, E.; Zavolan, M.; Rajewsky, N.; Schroeder, M.; Magnasco, M. and Darnell, J. E., Jr. (2003): Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes, *Genome Res* 13 [8], pp. 1863-72.
- Yang, J.; Mani, S. A.; Donaher, J. L.; Ramaswamy, S.; Itzykson, R. A.; Come, C.; Savagner, P.; Gitelman, I.; Richardson, A. and Weinberg, R. A. (2004): Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis, *Cell* 117 [7], pp. 927-39.
- Yea, S.; Narla, G.; Zhao, X.; Garg, R.; Tal-Kremer, S.; Hod, E.; Villanueva, A.; Loke, J.; Tarocchi, M.; Akita, K.; Shirasawa, S.; Sasazuki, T.; Martignetti, J. A.; Llovet, J. M. and Friedman, S. L. (2008): Ras promotes growth by alternative splicing-mediated inactivation of the KLF6 tumor suppressor in hepatocellular carcinoma, *Gastroenterology* 134 [5], pp. 1521-31.
- You, H.; Jin, J.; Shu, H.; Yu, B.; Milito, A. D.; Lozupone, F.; Deng, Y.; Tang, N.; Yao, G.; Fais, S.; Gu, J. and Qin, W. (2009): Small interfering RNA targeting the subunit ATP6L of proton pump V-ATPase overcomes chemoresistance of breast cancer cells, *Cancer Lett* 280 [1], pp. 110-9.
- Zeng, H.; Yucel, R.; Kosan, C.; Klein-Hitpass, L. and Moroy, T. (2004): Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells, *Embo J* 23 [20], pp. 4116-25.
- Zhou, X.; Benson, K. F.; Ashar, H. R. and Chada, K. (1995): Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C, *Nature* 376 [6543], pp. 771-4.
- Zimmermann, S. and Moelling, K. (1999): Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B), *Science* 286 [5445], pp. 1741-4.

- Zoumpourlis, V.; Papassava, P.; Linardopoulos, S.; Gillespie, D.; Balmain, A. and Pintzas, A. (2000): High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model, *Oncogene* 19 [35], pp. 4011-21.
- Zuber, J.; Tchernitsa, O. I.; Hinemann, B.; Schmitz, A. C.; Grips, M.; Hellriegel, M.; Sers, C.; Rosenthal, A. and Schafer, R. (2000): A genome-wide survey of RAS transformation targets, *Nat Genet* 24 [2], pp. 144-52.
- Zweidler-Mckay, P. A.; Grimes, H. L.; Flubacher, M. M. and Tschlis, P. N. (1996): Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor, *Mol Cell Biol* 16 [8], pp. 4024-34.

8 Anhang

Apoptose:

(*** 199_A2/5), (**Mock_Sc), (*Sc_siRNA), n.d. nicht detektierbar, (-) runter- (+) hochreguliert

Genname	Gen ID	***KRAS	**Sc	*Fosl1	*Fosl1	*Hmga2	*Hmga2	*Klf6	*Klf6	*JunB	*JunB	*Otx1	*Otx1	*Gfi1	*Gfi1	*RelA	*RelA
				(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Actn4	ENSRNOG00000020433	n.d.	n.d.	0,98	0,82	n.d.	n.d.	1,26	1,62	n.d.	n.d.	n.d.	1,42	n.d.	n.d.	0,92	1,01
Akr1d1	ENSRNOG00000004500	1,63	1,08	n.d.	n.d.	-0,79	-1,10	n.d.	n.d.	-1,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bard1	ENSRNOG000000014960	n.d.	n.d.	1,24	0,79	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bcl2	ENSRNOG000000002791	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Birc2	ENSRNOG000000010602	-1,71	n.d.	n.d.	n.d.	1,64	1,48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bnip3	ENSRNOG000000017243	0,95	n.d.	-2,02	-0,79	n.d.	n.d.	-1,86	-1,46	0,86	n.d.	-2,16	-2,16	-1,33	-1,30	-1,29	-1,09
Cdkn1a	ENSRNOG000000000521	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cdkn2b	ENSRNOG000000006735	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,74	0,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cflar	ENSRNOG000000012473	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,76	-1,23	-0,93	-1,43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Clu	ENSRNOG000000016460	-0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
lhpk2	ENSRNOG000000020361	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,96	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nqo1	ENSRNOG000000012772	n.d.	n.d.	-1,22	-1,21	n.d.	n.d.	-0,83	-0,95	n.d.	n.d.	-1,19	-0,86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pawr	ENSRNOG000000005917	n.d.	n.d.	0,81	0,77	1,05	-3,56	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phlda1	ENSRNOG000000004019	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,94	0,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ppp1r13b	ENSRNOG000000012653	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,99	-0,96	0,80	0,86	n.d.	n.d.
Prdx2	ENSRNOG000000003520	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,53	1,61	n.d.	n.d.
Prnp	ENSRNOG0000000021259	-1,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Serpine1	ENSRNOG000000001414	n.d.	n.d.	0,81	0,77	0,90	0,75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tgfa	ENSRNOG000000016182	1,88	n.d.	n.d.	n.d.	-0,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Trp53	ENSRNOG000000010756	-1,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tsg101	ENSRNOG000000013381	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vdr	ENSRNOG000000008574	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Zell-Zell-Kommunikation und extrazelluläre Matrix:

(***) 199_A2/5), (**Mock_Sc), (*Sc_siRNA), n.d. nicht detektierbar, (-) runter- (+) hochreguliert

Genname	Gen ID	***KRAS	**Sc	*Fosl1	*Fosl1	*Hmga2	*Hmga2	* Klf6	* Klf6	*JunB	*JunB	*Otx1	*Otx1	*Gfi1	*Gfi1	*RelA	*RelA
				(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Actr3	ENSRNOG00000003206	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,88	1,26	1,18	n.d.	n.d.
Armc2	ENSRNOG00000000805	-2,33	n.d.	1,36	1,54	1,97	2,45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ccdc80	ENSRNOG00000002052	-2,30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,33	1,14	n.d.	2,55	n.d.	n.d.	1,39	1,25	n.d.	n.d.
Cdh1	ENSRNOG000000020151	-1,95	n.d.	0,86	0,81	1,52	1,45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cdh2	ENSRNOG000000015602	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cdh3	ENSRNOG000000020129	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Col1a1	ENSRNOG000000003897	-6,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,19	1,47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cxadr	ENSRNOG000000001557	-1,41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cyr61	ENSRNOG000000014350	-3,62	n.d.	n.d.	n.d.	1,23	1,59	n.d.	n.d.	1,53	1,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Efemp1	ENSRNOG000000003553	-2,40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fn1	ENSRNOG000000014288	-3,64	n.d.	1,54	0,86	3,77	n.d.	n.d.	n.d.	-1,24	-0,77	0,86	1,55	1,56	1,43	1,32	1,24
Lgals3bp	ENSRNOG000000003217	n.d.	-2,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Lmo7	ENSRNOG000000009702	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,78	0,60	n.d.	n.d.	1,47	1,58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mamdc2	ENSRNOG000000024620	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mgp	ENSRNOG000000005695	-0,97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Msln	ENSRNOG000000019445	-3,36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,76	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,37	0,17
RGD1561090	ENSRNOG000000019977	-1,66	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rnd3	ENSRNOG000000004624	-1,20	n.d.	-1,04	-0,65	n.d.	-2,58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Scarb2	ENSRNOG000000002225	1,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,88	-1,24	n.d.	n.d.
Sdc1	ENSRNOG000000006396	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,57	1,71	n.d.	n.d.	1,23	1,50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sparc	ENSRNOG000000012840	-0,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tacstd1	ENSRNOG000000015667	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Timp2	ENSRNOG000000003148	-1,39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,64	n.d.	n.d.	1,12	1,31	n.d.	n.d.
Tor1aip1	ENSRNOG000000003946	1,09	n.d.	n.d.	n.d.	-0,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Zellzyklus, Zellwachstum und Differenzierung:

(** 199_A2/5), (**Mock_Sc), (*Sc_siRNA), n.d. nicht detektierbar, (-) runter- (+) hochreguliert

Genname	Gen ID	***KRAS	**Sc	*Fosl1 (1)	*Fosl1 (2)	*Hmga2 (1)	*Hmga2 (2)	*Klf6 (1)	*Klf6 (2)	*JunB (1)	*JunB (2)	*Otx1 (1)	*Otx1 (2)	*Gfi1 (1)	*Gfi1 (2)	*RelA (1)	*RelA (2)
Amd1	ENSRNOG00000000585	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ccnd1	ENSRNOG00000020918	2,73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,05	0,89	-1,39	-1,19	0,88	1,29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cdc20	ENSRNOG00000028415	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,93	-0,93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cdkn1b	ENSRNOG00000007249	-1,87	1,74	-0,86	-1,33	0,94	1,47	n.d.	n.d.	n.d.	1,27	-1,06	-1,72	1,44	1,33	n.d.	n.d.
Cdkn1b	ENSRNOG00000007249	-0,96	n.d.	n.d.	n.d.	0,88	0,83	n.d.	0,92	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cenpc1	ENSRNOG00000021776	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,99	0,96	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cul1	ENSRNOG00000005310	1,19	n.d.	n.d.	n.d.	-0,74	-1,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,31	1,26	0,92	1,57
Dab2	ENSRNOG00000028930	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ei24	ENSRNOG00000030391	n.d.	n.d.	-1,57	-1,34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,09	-1,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fbn1	ENSRNOG00000007302	-1,69	n.d.	1,28	0,90	1,46	1,20	n.d.	n.d.	1,00	0,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fen1	ENSRNOG00000020531	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Flii	ENSRNOG00000004159	1,22	n.d.	n.d.	n.d.	-1,32	-1,80	n.d.	n.d.	-0,85	-1,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fstl1	ENSRNOG00000002746	-2,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fstl1	ENSRNOG00000002746	-1,57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,07	1,01	0,75	0,95	1,21	1,12
Hrasls3	ENSRNOG00000021206	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,00	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Igfbp2	ENSRNOG00000016957	-1,74	n.d.	n.d.	n.d.	0,00	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Map1b	ENSRNOG00000017428	1,22	n.d.	n.d.	n.d.	-1,28	-1,75	1,32	1,49	n.d.	n.d.	1,35	0,93	1,17	0,80	n.d.	n.d.
Mcm4	ENSRNOG00000001833	n.d.	-0,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,93	1,14	n.d.	n.d.	1,46	2,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mmd	ENSRNOG00000002436	1,96	n.d.	-2,02	-1,02	-1,13	-0,73	1,40	2,38	n.d.	n.d.	1,55	1,49	2,53	1,90	1,61	1,93
Mycn	ENSRNOG00000006308	-1,71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ndc80	ENSRNOG00000013727	n.d.	0,71	-1,80	-1,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,17	1,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nf2	ENSRNOG00000007948	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nfic	ENSRNOG00000004505	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,91	0,91	1,29	1,43
Nrn1	ENSRNOG00000005915	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,80	-0,96	-1,01	-0,89	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Odz3	ENSRNOG00000018233	n.d.	n.d.	n.d.	-1,38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Parg	ENSRNOG00000019978	0,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pdgfa	ENSRNOG00000001312	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pik3cb	ENSRNOG00000016384	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Plk2	ENSRNOG000000011951	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pole2	ENSRNOG000000004242	n.d.	n.d.	-1,80	-1,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ppp1ca	ENSRNOG000000018708	0,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ptgs1	ENSRNOG000000007415	n.d.	n.d.	-1,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ptgs2	ENSRNOG000000002525	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rad50	ENSRNOG000000033065	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ralbp1	ENSRNOG000000013461	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rb1	ENSRNOG000000016029	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S100a4	ENSRNOG000000011821	2,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,23	0,70	n.d.	n.d.
Sema3d	ENSRNOG000000007202	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,91	1,16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Slfn3	ENSRNOG000000021357	0,75	-2,40	n.d.	n.d.	-0,97	-0,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,76	1,75	n.d.	n.d.	0,96	1,98
Smpd3	ENSRNOG000000000257	-0,99	n.d.	1,46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Strn3	ENSRNOG000000005585	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tacc2	ENSRNOG000000020457	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,89	-1,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tgfb1	ENSRNOG000000020652	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Top1	ENSRNOG000000030310	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,52	-0,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Wfdc1	ENSRNOG000000015904	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,98	0,81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Proliferation, Migration und Transformation:

(*** 199_A2/5), (**Mock_Sc), (*Sc_siRNA), n.d. nicht detektierbar, (-) runter- (+) hochreguliert

Genname	Gen ID	***KRAS	**Sc	*Fosl1 (1)	*Fosl1 (2)	*Hmga2 (1)	*Hmga2 (2)	*Klf6 (1)	*Klf6 (2)	*JunB (1)	*JunB (2)	*Otx1 (1)	*Otx1 (2)	*Gfi1 (1)	*Gfi1 (2)	*RelA (1)	*RelA (2)
Btg1	ENSRNOG000000004284	1,45	n.d.	n.d.	n.d.	-1,31	-1,22	0,79	0,78	n.d.	n.d.	1,00	0,76	1,17	0,93	1,32	0,82
Cd44	ENSRNOG000000006094	2,82	n.d.	n.d.	n.d.	-2,33	-2,44	n.d.	-0,79	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cdkn2a	ENSRNOG000000006664	-0,93	n.d.	n.d.	n.d.	0,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ctgf	ENSRNOG000000015036	-2,86	n.d.	n.d.	1,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cxcl10	ENSRNOG000000022256	0,94	-3,67	n.d.	n.d.	-1,31	-0,96	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Egfr	ENSRNOG000000004332	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,51	-1,34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fgfr1	ENSRNOG000000016050	n.d.	n.d.	-2,10	-2,59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Grn	ENSRNOG000000021031	1,63	n.d.	-3,31	-2,40	-1,42	-2,09	-2,22	-2,59	n.d.	n.d.	-1,14	-1,16	-0,73	-1,69	-1,00	-0,97
Hbegf	ENSRNOG000000018646	n.d.	n.d.	3,63	1,46	n.d.	0,98	1,49	1,29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Id2	ENSRNOG000000007237	0,72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,75	-1,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Ifitm3	ENSRNOG00000015078	-1,47	-4,00	1,58	1,14	1,51	0,78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,06	2,59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Igf2	ENSRNOG00000020369	-0,93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Il13ra1	ENSRNOG00000013170	-1,89	n.d.	1,81	0,88	n.d.	n.d.	1,62	1,51	n.d.	n.d.	1,52	1,29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kitl	ENSRNOG00000005386	0,86	n.d.	-1,28	-0,71	-0,91	-0,73	1,50	1,06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mmp2	ENSRNOG00000016695	-0,84	n.d.	-1,17	-1,09	0,73	0,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mmp3	ENSRNOG000000032626	2,09	n.d.	-2,51	-2,95	-0,94	-1,11	-1,68	n.d.	-1,49	-1,79	-2,20	-1,49	-1,29	n.d.	-1,72	-2,03
Mmp10	ENSRNOG000000032832	3,38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-2,08	-0,97	-1,15	-1,66	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mmp13	ENSRNOG00000008478	n.d.	n.d.	-2,38	-2,57	n.d.	n.d.	-1,31	n.d.	n.d.	n.d.	-1,10	-2,09	n.d.	n.d.	-1,10	-1,47
Odc1	ENSRNOG00000005424	n.d.	n.d.	0,95	0,63	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,79	0,85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Plagl1	ENSRNOG00000025587	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,05	2,64	n.d.	n.d.	2,56	1,60	n.d.	n.d.
Plaur	ENSRNOG000000037931	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,86	0,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,93	0,80	1,05	n.d.
S100a4	ENSRNOG00000011821	-1,41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
St5	ENSRNOG00000013934	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tagln	ENSRNOG00000017628	-1,75	n.d.	n.d.	n.d.	1,15	1,21	n.d.	n.d.	0,79	0,57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tert	ENSRNOG00000025327	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tgfb1i1	ENSRNOG00000019965	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Thbs1	ENSRNOG00000010529	-2,88	n.d.	1,37	2,84	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,30	2,68	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vegfa	ENSRNOG00000019598	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,67	-0,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zfp37	ENSRNOG00000013609	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Transkription:

(*** 199_A2/5), (**Mock_Sc), (*Sc_siRNA), n.d. nicht detektierbar, (-) runter- (+) hochreguliert

Genname	Gen ID	***KRAS	**Sc	*Fosl1	*Fosl1	*Hmga2	*Hmga2	*Klf6	*Klf6	*JunB	*JunB	*Otx1	*Otx1	*Gfi1	*Gfi1	*RelA	*RelA
				(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Bhlhb8	ENSRNOG00000025164	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bhlhe40	ENSRNOG00000007152	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cbfb	ENSRNOG00000014647	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cebpg	ENSRNOG00000021144	0,82	n.d.	n.d.	n.d.	-0,72	-0,87	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,05	0,97	n.d.	n.d.
Csf1	ENSRNOG00000018659	n.d.	n.d.	-0,76	-1,37	n.d.	n.d.	-0,84	-0,86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ctnnd2	ENSRNOG00000010649	2,02	n.d.	n.d.	n.d.	-1,39	-0,68	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,09	-1,15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ddit3	ENSRNOG00000006789	0,71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-2,02	-1,72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Ddx5	ENSRNOG000000030680	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,89	1,43	0,88	1,01	0,99	1,16
Dnahc6	ENSRNOG000000004342	n.d.	n.d.	1,25	1,40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,08	1,38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dnmt3a	ENSRNOG000000026649	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dnmt3b	ENSRNOG000000010625	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
E2f5	ENSRNOG000000010760	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,63	1,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Egr1	ENSRNOG000000019422	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,56	1,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Elk1	ENSRNOG000000010171	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Elk4	ENSRNOG000000007887	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ets1	ENSRNOG000000008941	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Etv1	ENSRNOG000000006867	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,06	-1,31
Fosl1	ENSRNOG000000020552	1,96	n.d.	-1,95	-1,37	-1,20	-1,11	1,01	0,86	n.d.	-0,97	0,79	0,71	n.d.	n.d.	n.d.	0,94	1,38
Fosl2	ENSRNOG000000020552	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Foxa1	ENSRNOG000000009284	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Foxe1	ENSRNOG000000023497	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Gfi1	ENSRNOG000000002042	1,38	n.d.	1,09	0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,34	-1,05	n.d.	n.d.
Gtf2i	ENSRNOG000000001479	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,35	1,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hes3	ENSRNOG000000010893	1,34	n.d.	n.d.	n.d.	-0,79	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hif1a	ENSRNOG000000008292	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hivep2	ENSRNOG000000011015	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,70	0,72	n.d.	n.d.
Hmga2	ENSRNOG000000038467	2,68	n.d.	0,84	n.d.	-2,34	-1,75	0,78	0,76	n.d.	-0,82	1,05	0,77	1,57	1,03	n.d.	n.d.	n.d.
Hnf1a	ENSRNOG000000001183	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,83	-0,75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hoxa2	ENSRNOG000000005968	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hoxa5	ENSRNOG000000006466	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,64	1,48	n.d.	n.d.	-1,14	-1,25
Id1	ENSRNOG000000021750	n.d.	-2,27	2,60	1,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,04	1,22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Id3	ENSRNOG000000026124	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Id4	ENSRNOG000000016099	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
lkbkap	ENSRNOG000000016725	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Jun	ENSRNOG000000026293	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,77	0,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
JunB	NM_021836	0,89	n.d.	-1,35	-1,07	-0,91	-1,11	-0,77	-0,81	-0,98	-1,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
JunD	ENSRNOG000000039274	-1,49	n.d.	-1,57	-1,29	n.d.	n.d.	-0,83	-1,43	n.d.	n.d.	-1,23	-0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Klf10	ENSRNOG000000006118	0,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Klf6	ENSRNOG000000016885	0,77	n.d.	-1,23	-1,35	n.d.	n.d.	-0,83	-0,94	n.d.	-0,92	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,01	0,10
Klf6	ENSRNOG000000016885	1,18	n.d.	-0,97	-0,69	-0,87	-0,70	-0,94	-0,85	n.d.	n.d.	-0,71	-1,35	-0,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mki67	ENSRNOG000000025701	1,11	n.d.	1,08	n.d.	-1,31	-0,84	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,97	1,64	1,14	1,03	n.d.	n.d.
Mybbp1a	ENSRNOG000000015236	0,84	n.d.	n.d.	n.d.	-0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Myf6	ENSRNOG00000004878	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Myod1	ENSRNOG000000011306	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Myog	ENSRNOG000000030743	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nab1	ENSRNOG000000012959	0,93	n.d.	n.d.	n.d.	-0,85	-0,71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nfix	ENSRNOG000000002983	1,34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,02	0,94	1,21	n.d.	1,27	1,34
Nfyb	ENSRNOG000000010309	-0,95	n.d.	n.d.	n.d.	0,91	1,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,33	1,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Otx1	ENSRNOG000000008756	2,30	n.d.	0,97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-2,09	-1,43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pias1	ENSRNOG000000034272	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,04	1,27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ppard	ENSRNOG000000000503	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,12	-1,31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,28	-1,21	n.d.	n.d.
Pthlh	ENSRNOG000000036924	n.d.	n.d.	1,25	1,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ptpmt1	ENSRNOG000000032404	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RelA	ENSRNOG000000030888	n.d.	n.d.	-0,86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,80	-0,92
Rest	ENSRNOG000000002074	-0,95	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,42	n.d.	n.d.	n.d.	1,11	1,21	n.d.	n.d.	1,27	1,31
Rnf4	ENSRNOG000000013930	n.d.	n.d.	-2,02	-1,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Runx1	ENSRNOG000000001704	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Runx2	ENSRNOG000000020193	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Scmh1	ENSRNOG000000032183	4,02	n.d.	n.d.	n.d.	-2,65	-1,55	n.d.	n.d.	-1,86	-1,29	-1,63	-1,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Smarca4	ENSRNOG000000009271	n.d.	n.d.	0,99	0,75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,92	n.d.	n.d.	n.d.	0,96	0,91	n.d.	n.d.
Snd1	ENSRNOG000000031173	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,37	-1,53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sox11	ENSRNOG000000030034	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sp1	ENSRNOG000000014084	n.d.	n.d.	-1,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Srf	ENSRNOG000000018232	-1,29	n.d.	n.d.	n.d.	1,36	0,74	n.d.	n.d.	0,90	1,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ssbp3	ENSRNOG000000007920	n.d.	n.d.	0,71	1,28	n.d.	n.d.	0,86	1,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Stat5a	ENSRNOG000000019496	-1,38	n.d.	n.d.	n.d.	1,24	1,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sub1	ENSRNOG000000011558	-2,54	n.d.	3,43	2,14	n.d.	n.d.	1,52	1,44	n.d.	n.d.	0,95	1,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tcea1	ENSRNOG000000023497	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tcf3	ENSRNOG000000009605	-1,43	n.d.	-1,91	-1,19	1,42	1,20	n.d.	n.d.	-0,80	n.d.	n.d.	n.d.	-1,02	-1,21	n.d.	n.d.
Tcfec	ENSRNOG000000006066	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tead2	ENSRNOG000000020695	-0,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tmpo	ENSRNOG000000008797	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,47	1,78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Usf2	ENSRNOG000000021030	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Wt1	ENSRNOG000000013074	-1,12	n.d.	n.d.	n.d.	1,39	1,36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zfp180	ENSRNOG000000029336	n.d.	n.d.	1,83	1,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zfp260	ENSRNOG000000020762	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zfp361l	ENSRNOG000000030024	-0,92	n.d.	n.d.	n.d.	1,10	0,92	0,95	0,83	n.d.	n.d.	1,37	1,27	1,40	1,66	n.d.	n.d.

Zfp382	ENSRNOG000000020777	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zfyve27	ENSRNOG000000014903	0,74	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,32	-1,30	n.d.	n.d.	n.d.

Stoffwechsel:

(*** 199_A2/5), (**Mock_Sc), (*Sc_siRNA), n.d. nicht detektierbar, (-) runter- (+) hochreguliert

Genname	Gen ID	***KRAS	**Sc	*Fosl1	*Fosl1	*Hmga2	*Hmga2	*Klf6	*Klf6	*JunB	*JunB	*Otx1	*Otx1	*Gfi1	*Gfi1	*RelA	*RelA
				(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Abcb4	ENSRNOG000000029207	n.d.	n.d.	-1,30	-1,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,97	-1,36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Abcc4	ENSRNOG000000010064	1,28	n.d.	-1,04	-1,31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Abcc4	ENSRNOG000000010064	2,02	n.d.	-1,32	-1,04	-2,03	-1,39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,48	-1,75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Abcc5	ENSRNOG000000029178	-0,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Akr1b7	ENSRNOG000000009875	0,92	n.d.	n.d.	n.d.	-0,71	-0,81	n.d.	-0,96	n.d.	n.d.	-1,43	-1,40	n.d.	1,01	-1,00	-1,03
Aldh7a1	ENSRNOG000000014645	-0,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,43	-1,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Alox15	ENSRNOG000000019183	1,54	n.d.	-0,87	-1,76	n.d.	n.d.	0,97	1,28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ctsd	ENSRNOG000000020206	n.d.	n.d.	-0,92	-0,87	n.d.	n.d.	-1,56	-1,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ddx24	ENSRNOG000000009166	-0,92	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Edem1	ENSRNOG000000007944	1,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-2,04	-2,20	n.d.	n.d.	-1,12	-1,10
Efemp2	ENSRNOG000000020587	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,07	1,59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fah	ENSRNOG000000013223	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,27	-0,71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,06	1,28
Hprt1	ENSRNOG000000031367	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Klf22	ENSRNOG000000020281	n.d.	n.d.	2,87	2,01	n.d.	n.d.	1,71	1,39	n.d.	n.d.	1,11	1,95	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Loxl2	ENSRNOG000000016758	1,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Man2a1	ENSRNOG000000015439	-0,72	n.d.	n.d.	n.d.	0,79	0,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,77	n.d.	n.d.	n.d.
Nbl1	ENSRNOG000000030149	-1,49	n.d.	n.d.	n.d.	1,27	1,28	n.d.	n.d.	-1,20	-0,85	1,74	1,30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nr3c1	ENSRNOG000000014096	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,85	1,45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nup155	ENSRNOG000000013411	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pla1a	ENSRNOG000000027252	1,12	n.d.	n.d.	n.d.	-0,71	-0,76	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,00	-1,22	n.d.	n.d.
Slc16a1	ENSRNOG000000019996	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,21	-0,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Slc2a8	ENSRNOG000000022274	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sort1	ENSRNOG000000031814	-1,50	n.d.	n.d.	n.d.	0,78	0,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sqstm1	ENSRNOG000000003147	1,41	n.d.	n.d.	n.d.	-1,55	-1,30	-0,99	-0,82	-0,88	-0,44	-1,26	-1,27	-1,13	n.d.	-0,98	-1,34

Yes1 ENSRNOG00000037227 n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d.

Signaltransduktion:

(** 199_A2/5), (**Mock_Sc), (*Sc_siRNA), n.d. nicht detektierbar, (-) runter- (+) hochreguliert

Genname	Gen ID	***KRAS	**Sc	*Fosl1	*Fosl1	*Hmga2	*Hmga2	*Klf6	*Klf6	*JunB	*JunB	*Otx1	*Otx1	*Gfi1	*Gfi1	*RelA	*RelA
				(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Aes	ENSRNOG00000029133	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Akap11	ENSRNOG00000009987	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,82	-0,84	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Akap12	ENSRNOG00000019549	-1,70	n.d.	n.d.	n.d.	1,70	1,55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Arpp19	ENSRNOG00000023086	-0,70	n.d.	1,00	0,95	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,98	1,41	1,71	1,02	1,20	1,91
Basp1	ENSRNOG00000025188	-2,58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Camk1	ENSRNOG00000017923	0,81	n.d.	-0,85	-0,73	-0,95	-0,81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,31	n.d.	n.d.	n.d.
Camk2d	ENSRNOG00000011589	-0,74	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,97	-1,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cav1	ENSRNOG00000006694	n.d.	n.d.	0,91	n.d.	n.d.	n.d.	-1,55	-0,92	n.d.	n.d.	0,96	1,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cav2	ENSRNOG00000006411	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,80	-0,83	n.d.	n.d.
Clk1	ENSRNOG00000025768	n.d.	n.d.	-0,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,09	n.d.	n.d.	n.d.	1,23	1,40
Dcl1	ENSRNOG00000032922	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,46	-1,85
Dock8	ENSRNOG00000015894	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dusp1	ENSRNOG00000003977	n.d.	n.d.	-1,12	-1,60	n.d.	n.d.	-1,12	-0,76	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dusp4	ENSRNOG00000011921	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,05	1,57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dusp5	ENSRNOG00000014061	3,06	n.d.	-1,31	n.d.	-1,84	-1,86	n.d.	n.d.	-1,06	-1,27	-1,36	-1,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dusp6	ENSRNOG00000023896	1,27	-1,79	2,38	1,99	-1,14	-1,28	2,20	2,00	n.d.	n.d.	1,42	2,14	1,46	0,99	1,20	0,94
Dusp9	ENSRNOG00000025298	n.d.	n.d.	2,91	1,19	n.d.	n.d.	2,04	1,72	n.d.	n.d.	1,80	1,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Efna1	ENSRNOG00000020573	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,00	-1,15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fgf16	ENSRNOG00000002560	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fgf2	ENSRNOG00000017392	n.d.	n.d.	1,83	0,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fhl2	ENSRNOG00000016866	1,02	n.d.	1,43	1,75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,27
G3bp1	ENSRNOG00000013186	0,92	n.d.	n.d.	n.d.	-1,16	-0,80	1,42	1,64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Gbp2	ENSRNOG00000031743	3,36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,00	0,61	0,87	0,76	n.d.	n.d.
Gnas	ENSRNOG00000010440	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hmmr	ENSRNOG00000003202	n.d.	n.d.	1,69	1,39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,16	1,63	0,91	0,84	n.d.	n.d.

Hras	ENSRNOG00000016611	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Impa1	ENSRNOG00000010482	-0,74	n.d.	n.d.	n.d.	0,72	0,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Jak1	ENSRNOG00000011157	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kras	ENSRNOG00000009338	4,29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,23	1,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LOC686310	ENSRNOG000000031801	-1,28	n.d.	n.d.	n.d.	0,85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,40	1,32	1,00	0,96	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Map2k1	ENSRNOG00000010176	1,78	n.d.	-0,93	-0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,10	-1,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Men1	ENSRNOG000000021054	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Met	ENSRNOG00000007079	-0,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nf1	ENSRNOG00000013780	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nras	ENSRNOG00000023079	0,72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pak1	ENSRNOG00000029784	-0,88	n.d.	n.d.	n.d.	1,11	1,62	1,93	0,99	0,79	0,92	0,96	1,13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pdcl	ENSRNOG00000008484	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pde3b	ENSRNOG00000011417	1,33	n.d.	n.d.	n.d.	-1,23	-2,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,72	0,67	0,81	1,36	n.d.	n.d.	n.d.
Pdpk1	ENSRNOG00000006136	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,14	0,48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pik3c2a	ENSRNOG00000020479	-0,75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Plau	ENSRNOG00000010516	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,15	1,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prkar2b	ENSRNOG00000009079	n.d.	n.d.	1,08	1,47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prkar2b	ENSRNOG00000009079	0,79	n.d.	n.d.	n.d.	-0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,97	1,04	1,29	n.d.	n.d.	1,45	1,09	n.d.
Rab5a	ENSRNOG00000012180	n.d.	n.d.	-1,65	-1,72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rab7	ENSRNOG00000012247	0,71	n.d.	n.d.	n.d.	-0,92	-0,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rabl2a	ENSRNOG00000013947	-0,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rap1a	ENSRNOG00000032463	0,95	n.d.	n.d.	n.d.	-0,96	-1,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,85	0,84	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rap1b	ENSRNOG00000007048	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rasa1	ENSRNOG00000029185	2,34	n.d.	1,32	1,64	n.d.	-1,09	1,08	1,08	0,76	0,83	0,88	0,82	2,25	2,72	0,88	0,95	n.d.
Ret	ENSRNOG00000014751	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rhoa	ENSRNOG00000002491	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,16	0,96	n.d.	n.d.	n.d.
Rhob	ENSRNOG000000021403	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rhoc	ENSRNOG00000012630	1,30	n.d.	n.d.	n.d.	-1,21	-0,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,07	-1,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ril	ENSRNOG00000011343	-1,58	n.d.	n.d.	n.d.	1,58	1,34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rock2	ENSRNOG00000004496	2,22	n.d.	n.d.	n.d.	-2,05	-0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,96	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rsu1	ENSRNOG00000017595	1,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sh3bp5	ENSRNOG00000019475	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,93	-0,85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Stk3	ENSRNOG00000011278	-0,74	n.d.	n.d.	n.d.	0,94	1,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Syngap1	ENSRNOG00000000483	0,91	n.d.	1,32	1,64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tank	ENSRNOG00000008859	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Thy1	ENSRNOG00000006604	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tle4	ENSRNOG00000013239	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zfand5	ENSRNOG00000018107	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Sonstige:

(** 199_A2/5), (**Mock_Sc), (*Sc_siRNA), n.d. nicht detektierbar, (-) runter- (+) hochreguliert

Genname	Gen ID	***KRAS	**Sc	*Fosl1 (1)	*Fosl1 (2)	*Hmga2 (1)	*Hmga2 (2)	*Klf6 (1)	*Klf6 (2)	*JunB (1)	*JunB (2)	*Otx1 (1)	*Otx1 (2)	*Gfi1 (1)	*Gfi1 (2)	*RelA (1)	*RelA (2)
Actb	ENSRNOG00000034254	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ahnak 1	ENSRNOG00000020192	n.d.	n.d.	0,96	0,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,03	1,07	2,52	1,82	1,01	1,06
Ankrd52	ENSRNOG00000030597	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bnc1	ENSRNOG00000019770	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Chmp2a	ENSRNOG00000027514	1,53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,74	n.d.	n.d.	n.d.	-1,14	-0,92	n.d.	n.d.	-1,12	-0,92
Cps1	ENSRNOG00000010233	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,82	0,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Erlin2	ENSRNOG00000013763	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ets2	ENSRNOG00000001647	-1,49	n.d.	n.d.	n.d.	1,68	1,09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,13	-1,42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fhl3	ENSRNOG00000007541	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Frat1	ENSRNOG00000024429	-1,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fyco1	ENSRNOG00000006336	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Gapdh	ENSRNOG00000033135	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Gcn5l2	ENSRNOG00000018364	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hrasls5	ENSRNOG00000023528	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hyou1	ENSRNOG00000010944	-2,16	2,84	-1,52	-0,64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-2,44	-3,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Igf2bp2	ENSRNOG00000025946	3,27	n.d.	-0,81	-0,86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,79	n.d.	n.d.	0,89	n.d.	n.d.	n.d.
Itgb5	ENSRNOG00000001795	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,70	-0,66	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LOC294446	ENSRNOG00000000579	-1,02	n.d.	-0,88	n.d.	1,13	0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LOC681578	ENSRNOG00000029209	n.d.	n.d.	-2,72	-1,05	n.d.	n.d.	n.d.	0,77	n.d.	n.d.	-0,71	-0,67	n.d.	n.d.	-0,98	-1,36
LOC688393	ENSRNOG00000004941	n.d.	n.d.	1,57	1,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Lonp1	ENSRNOG00000038952	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,30	n.d.	-0,99	-0,85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mmp10	ENSRNOG00000032832	-1,61	n.d.	n.d.	n.d.	1,18	1,45	n.d.	n.d.	1,09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Myh3	ENSRNOG00000031497	2,80	n.d.	n.d.	n.d.	-0,70	-1,58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Nol5a	ENSRNOG00000007128	-0,92	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nxn	ENSRNOG00000008178	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pdia6	ENSRNOG000000039535	-1,86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pgrmc2	ENSRNOG000000014051	-0,73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phc2	ENSRNOG00000006004	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phf2	ENSRNOG000000016816	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ppp2r5a	ENSRNOG000000000068	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prcc	ENSRNOG000000012933	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,13	1,55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prph	ENSRNOG000000015643	-2,16	n.d.	n.d.	n.d.	1,81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prss23	ENSRNOG000000017307	n.d.	n.d.	1,22	0,92	n.d.	-0,85	n.d.	n.d.	0,81	0,45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RGD1311744	ENSRNOG000000005960	n.d.	n.d.	1,34	1,50	n.d.	n.d.	0,79	1,38	n.d.	n.d.	1,47	0,98	1,84	1,38	1,11	1,08
RGD1563516	ENSRNOG000000033298	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rps9	ENSRNOG000000011355	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sbf1	ENSRNOG000000008392	1,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,88	-1,24	n.d.	n.d.
Sf3a1	ENSRNOG000000005218	1,51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tgfb2	ENSRNOG000000013265	-2,58	n.d.	n.d.	n.d.	1,00	1,11	n.d.	n.d.	n.d.	0,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tpm1	ENSRNOG000000016731	-0,92	n.d.	1,53	0,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,70	1,55	1,19	1,11
Tuba1a	ENSRNOG000000004559	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vps35	ENSRNOG000000017612	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,93	-2,11	-0,93	-0,75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

9 Publikationen und Tagungsbeiträge

Tagungsbeiträge:

Toward elucidating transcriptional networks triggering oncogenesis

Stelniec I., Tchernitsa O., Sers C., Schäfer R.

3rd Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society.

Berlin, Germany

October 4-6, 2007

Aufklärung transkriptioneller Netzwerke in der Onkogenese mit Hilfe von Systemanalysen.

Stelniec I., Tchernitsa O., Legewie S., Herzel H-P., Sers C., Schäfer R.

92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V.

Berlin, Germany

May 15-18, 2008

Der Pathologe, Supplement 1, 2008

Elucidation of transcriptional networks triggering oncogenesis mediated by Ras oncogenes.

Stelniec I., Legewie S., Tchernitsa O., Malek A., Sers C., Schäfer R.

15th International AEK Cancer Congress

Berlin, Germany

March 18-20, 2009

Publikationen:

Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells.

Sers C., Kuner R., Falk C.S., Lund P., Sueltmann H., Braun M., Buness A., Ruschhaupt M., Conrad J., Mang-Fatehi S., **Stelniec I.**, Krapfenbauer U., Poustka A., Schäfer R.

Int J Cancer. 2009 May 4.

The role of the architectural transcription factor HMGA2 in controlling the genetic program mediated by mutant KRAS in ovarian epithelial cells.

Malek, A., **Stelniec I.**, Tchernitsa O., Sers C., Schäfer R.

2009 eingereicht.